Expressionsmodulation stammzell-assoziierter Gene mittels kurzer Polypeptide

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemiker Frank Wenke,
geboren am 1.5.1982 in Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Mrowka, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Otmar Huber, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Stefan Wölfl, Universität Heidelberg

Tag der öffentlichen Verteidigung:

1.7.2014

Abstract

Stem cells and especially embryonic stem cells are of great interest in basic research and regenerative medicine. Due to massive ethical concerns, the work with embryonic stem cells is strictly regulated. Therefore the discovery of reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPS) by viral transduction of four transcription factors *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* and *C-MYC* has been a great value. The clinical application of iPS cells represents a promising therapeutic approach. However, for cell replacement therapy, techniques utilizing viral gene transfer cannot be used due to their incalculable risk of deleterious mutations. To overcome this issue, alternative strategies were investigated. The aim of this study was to establish a promoter based screening tool, to discover short polypeptides, which modulate the expression of stem cell related genes such as *OCT4*. Basically a tri functional reporter construct LEP (luciferase, EGFP, puromycin-resistance) was designed and stable expressed in human embryonic kidney cells permitting a high-throughput screening using a peptide library. A simultaneous screening procedure via antibiotic or flow cytometry yielded for both selection strategies putative candidates. The flow cytometry selection resulted in more positive hits in less time than the antibiotic selection. All obtained polypeptides were confirmed by rescue RCR and additional sequence homology analysis showed an association to cell cycle processes. Besides the identification of novel short peptide aptamers activating the human *OCT4* promoter, the developed experimental platform can also be used to study other stem cell related genes such as *NANOG* or *SOX2*. Consequently, the results are potentially of great benefit to understand and optimize the generation of iPS, which remains a desirable approach for cell therapy.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 4
Abbildungsverzeichnis 7
Tabellenverzeichnis 8
Abkürzungsverzeichnis 9
1 Zusammenfassung 13
2 Einleitung 15
2.1 Stammzellen 15
2.1.1 Embryonale Stammzellen 17
2.1.2 Adulte Stammzellen 18
2.2 Reprogrammierung von somatischen Zellen 19
2.2.1 Reprogrammierungsverfahren 19
2.2.2 Induzierte pluripotente Stammzellen 20
2.3 Mechanismen der Reprogrammierung 21
2.3.1 Molekulare Mechanismen 22
2.3.2 Epigenetische Einflüsse 23
2.4 Strategien zur iPS Generierung 24
2.4.1 Reprogrammierung durch virale Transkriptionsfaktorinduktion 24
2.4.2 „Virusfreie“ Reprogrammierung 24
2.4.3 *Small molecules* und miRNA 25
2.5 Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen 26
2.5.1 Grundlagenforschung 26
2.5.2 Regenerative Medizin 27
2.6 Peptidaptamere und randomisierte Peptidbibliotheken 28
2.6.1 Kombinatorische biologische Bibliotheken 29
2.6.2 Peptid-Display-Methoden 30
2.7 Zellbasierte Reportergenassays in Hochdurchsatzscreenings 32
2.7.1 Reportergene und Selektionsmarker 33
2.7.2 Erzeugung stabiler Reporterzelllinien 34
3 Ziel der Arbeit 36
4 Material und Methoden 38
4.1 Molekularbiologie 38
4.1.1 Molekularbiologische und biochemische Standardmethoden 38
4.1.2 Oligonukleotide und PCR Primer 39
4.1.3 Konstruktdesign 40
4.1.4 Klonierung 41
4.1.5 Southern Blot 41
4.1.5.1 Southern Blot Sonde 42
4.1.5.2 Restriktionsverdau und Bloting 42
4.1.5.3 Hybridisierung und Detektion 43

4.1.6 Randomisierte Peptidbibliothek 44
4.1.7 Identifizierung der Peptidsequenzen (*Rescue PCR*) 45
4.2 Zellbiologische Methoden 46
4.2.1 Zelllinien und Standardkulturbedingungen 46
4.2.2 Transiente Transfektion 46
4.2.3 Generierung stabiler isogener Zelllinien 47
4.2.4 Retroviraler Gentransfer der Peptidbibliothek 47
4.3 *In vitro* Analyse Methoden 48
4.3.1 Transiente Luciferase-Assays 48
4.3.2 *In vivo* Messungen der Luciferaseaktivität 49
4.3.3 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse) 49
4.4 Statistik 49
4.5 Optische Darstellung der Zellen (Mikroskopie) 50
5 Ergebnisse 51
5.1 Design und Herstellung der LEP-Reporterkonstrukte 51
5.2 Funktionelle Erprobung der LEP-Reporterkonstrukte 53
5.3 Herstellung und Funktionstest der Reporterzelllinien 53
5.4 Nachweis der genomischen Insertion der Reporterkonstrukte 56
5.5 Design einer kombinatorischen biologischen Bibliothek 57
5.6 Retroviraler Gentransfer der Peptidbibliothek 59
5.7 Selektion aktivierter Zellen nach Transduktion der Peptidbibliothek 61
5.7.1 Puromycinselektion 62
5.7.2 FACS-Selektion 64
5.8 Rescue PCR zur Identifizierung der Peptidsequenzen 66
5.9 Validierung der Screeningergebnisse 69
5.9.1 Validierung der Ergebnisse nach der Puromycinselektion 69
5.9.2 Validierung der Ergebnisse nach der FACS-Selektion 70
5.9.3 Validierung der Ergebnisse nach der Einzelzellsortierung 71
5.10 Bioinformatische Auswertungen putativer Targets 72
5.10.1 *In silico* Translation putativer Targets 72
5.10.2 Sequenzhomologieanalyse (BLAST-Analyse) 73
6 Diskussion 75
6.1 HEK-Zell-basierte Reportersysteme 75
6.2 Reporterkonstrukt 76
6.3 Stabile Reporterzelllinien 77
6.4 Einsatz promotorabhängiger Screeningsysteme 79
6.5 Interpretation der Ergebnisse promotorabhängiger Assaysysteme 79
6.6 Peptidaptamere 81
6.7 Retroviraler Transfer der Peptidbibliothek 82
6.8 Wirkmechnismen der Peptidaptamere 83
6.9 Vergleich der verwendeten Selektionsstrategien 84

6.10 Bewertungen der Ergebnisse und weiterführende Experimente 86
6.11 Sequenzhomologieanalysen 87
6.12 Mögliche klinische Relevanz der Ergebnisse 88
Literaturverzeichnis 91
Anhang 106
Danksagung 106
Ehrenwörtliche Erklärung 107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Differenzierungspotential von Stammzellen	16
Abbildung 2:	Gewinnung und Verwendung pluripotenter Stammzellen *in vitro*	17
Abbildung 3:	Zelldifferenzierung und Reprogrammierung	20
Abbildung 4:	Schlüsselregulatoren der Selbsterneuerung und Differenzierung	22
Abbildung 5:	Direkte Reprogrammierung somatischer Zellen	26
Abbildung 6:	Gewinnung und Verwendung induzierter pluripotenter Stammzellen	27
Abbildung 7:	Funktionsweise zellbasierter Reportergenassays	32
Abbildung 8:	Versuchsdesign	37
Abbildung 9:	Aufbau der *backbone* Konstrukte	40
Abbildung 10:	Southern Blot Analysen	43
Abbildung 11:	Ablauf des retroviralen PB-Transfers	48
Abbildung 12:	*Backbone*- und Reporterkonstrukte	52
Abbildung 13:	Funktionstest der Reporterkonstrukte I	54
Abbildung 14:	Funktionstest der Reporterkonstrukte II	55
Abbildung 15:	Funktionstest der Reporterkonstrukte III	56
Abbildung 16:	Integrationsnachweis der Konstrukte durch Southern Blot Analysen	57
Abbildung 17:	Peptidbibliothekskonstrukt	58
Abbildung 18:	Retrovirale Transduktion	60
Abbildung 19:	Screeningstrategien und Targetidentifizierung	62
Abbildung 20:	Selektion aktivierter Zellklone	63
Abbildung 21:	Puromycinselektion	64
Abbildung 22:	FACS-Selektion I	65
Abbildung 23:	FACS-Selektion II	66
Abbildung 24:	*Rescue PCR*	67
Abbildung 25:	Validierung von Einzelklonen nach der Puromycinselektion	70
Abbildung 26:	Validierung von Einzelklonen nach der FACS-Selektion I	71
Abbildung 27:	Validierung von Einzelklonen nach der FACS-Selektion II	72
Abbildung 28:	Protein-Sequenzalignments	73
Abbildung 29:	BLAST-Analysen ausgewählter Polypeptide	74
Abbildung 30:	Strategien zur Generierung stabiler Zelllinien	78
Abbildung 31:	Mögliche Wirkmechanismen der aktivierenden Polypeptide	84
Abbildung 32:	Weiterführende Versuche (Ausblick I)	87
Abbildung 33:	Mögliche klinische Verwendung der Ergebnisse (Ausblick II)	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einsatzgebiete der Peptidaptamere	29
Tabelle 2:	Peptid-Display-Methoden	30
Tabelle 3:	Standardkits	38
Tabelle 4:	Oligonukleotide und PCR Primer	39
Tabelle 5:	Durchführung Southern Blot	42
Tabelle 6:	Programm der Auffüllreaktion	44
Tabelle 7:	*Touchdown Rescue PCR* Programm	45
Tabelle 8:	Übersicht verwendeter Zelllinien	46
Tabelle 9:	Genomische Lokalisation der humanen Promotorsequenzen	53
Tabelle 10:	Peptidsequenzen von Einzelklonen	68
Tabelle 11:	Vergleich der verwendeten Selektionsstrategien	85

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Base)
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AS	adulte Stammzellen
As	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	engl. *basic local alignment search tool*
BLAT	engl. *BLAST-like alignment tool*
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (Base)
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
chr	Chromosom
cm^2	Quadratzentimeter
d	Tag
DCLK1	engl. *doublecortin like kinase 1*
DIG	Digoxygenin
DMEM	Standardmedium (engl. *Dulbecco's modified Eagle's Medium*)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DsRed	rot fluoreszierendes Protein
EGFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. *enhanced green fluorescent protein*)
engl.	englisch
ES	embryonale Stammzellen
FACS	Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*)
FCCF	Abteilung Durchflusszytometrie (engl. *Flow Cytometry Core Facility*) am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin
Flp	Flippase (Flp Rekombinase)
FRT	Flp Erkennungsstelle (engl. *Flp recognition target*)

fw	Vorwärtsprimer (engl. *forward*)
g	Gramm
h	Stunde
h	human
HEK 293	humane embryonale Nierenzellline 293 (engl. *human embryonic kidney cell linie 293*)
HisTag	engl. *polyhistidine-tag*
hnT	Stunden nach Transfektion
HOXA1	engl. *homeobox protein A1*
HTS	Hochdurchsatzscreening
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
K	Wobblebase (K codiert für G, T)
KLF4	engl. *kruppel-like factor 4*
LB	Bakteriennährmedium (engl. *lysogeny broth*)
l	Liter
LEP	Luciferase-EGFP-Puromycin
LIF	Leukämie inhibierender Faktor (engl. *leukemia inhibitory factor*)
Luc	Luciferase
M	molare Masse
mol	Mol
MCS	Polylinker (engl. *multiple cloning site*)
miRNA	microRNA
mRNA	Boten-RNA (engl. *messenger RNA*)
min	Minute
n	Anzahl
N	Wobblebase (N codiert für A, C, G, T)
NANOG	*Tir nan Og*; nach einer irischen Sage „Land der ewigen Jugend“
NCBI	engl. *National Center of Biotechnology Information*
neg.	negativ
NLS	Kernlokalisationssignal (engl. *nuclear localization signal*)
NSD3L	NSD Histon Methyltransferase 3l (engl. *nuclear receptor SET domain-containing histone methyltransferase*)
Nt	Nukleotid
OCT4	engl. *octamer-binding transcription factor 4*

Oligo	Oligonukleotid
ORF	offener Leserahmen (engl. *open reading frame*)
p	p-Wert
pr	Promotor
P21	engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1*
P53	Protein 53
PA	Peptidaptamer
PB	Peptidbibliothek
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
pos.	positiv
POU5F1	engl. *POU class homeobox 1*
PP	Polypeptid
Puro	Puromycin
RF	Reprogrammierungsfaktor
RGA	Reportergen-Assay
RLU	relative Lichteinheit (engl. *relative light unit*)
RNA	Ribonukleinsäure
rv	Rückwärtsprimer (engl. *reverse*)
S	Sicherheitsstufe
SB	Southern Blot
SOX2	engl. *sex-determing region Y-Box 2*
SSEA1	engl. *stage specific embryonic antigen 1*
STAT3	engl. *signal transducer and activator of transcription 3*
T	Temperatur
T	Thymin (Base)
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktor
TGF-β	engl. *transforming growth factor-β*
s	Sekunde
U	Uracil (Base)
u.a.	unter anderen
UCSC	engl. *University of California, Santa Cruz*
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

Verwendete SI-Vorsätze

k	kilo (Faktor 10^3)
d	dezi (Faktor 10^{-1})
c	zenti (Faktor 10^{-2})
m	milli (Faktor 10^{-3})
µ	mikro (Faktor 10^{-6})
n	nano (Faktor 10^{-9})
p	piko (Faktor 10^{-12})

1 Zusammenfassung

Stammzellen sind körpereigene Vorläuferzellen, die über die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung verfügen. Diese Eigenschaften machen sie besonders für die Grundlagenwissenschaften und die regenerative Medizin interessant. Obwohl embryonale Stammzellen das größte Differenzierungspotential aufweisen, ist ihr Einsatz in der Forschung aufgrund ethischer Aspekte stark limitiert. Die Entdeckung der Reprogrammierung von somatischen Zellen stellte somit eine vielversprechende Alternative zur Gewinnung von pluripotenten Stammzellen dar. 2006 gelang es Shinya Yamanaka und Kollegen, durch ektopische Expression von nur vier Transkriptionsfaktoren (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* und *C-MYC*) somatische Zellen wieder zu Stammzellen zu reprogrammieren. Für eine medizinische Anwendung dieser induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) müssen Arbeitstechniken mit onkologischem Risikopotential ausgeschlossen und der Prozess der Reprogrammierung optimiert werden. Eine Möglichkeit dazu bieten promotorabhängige Reportergen-Assays. So konnten mit ihrer Hilfe bereits aus *small molecule* Bibliotheken Substanzen identifiziert werden, die zur Reprogrammierung von somatischen Zellen beitragen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein promotorabhängiges zell-basiertes Screeningsystem zu etablieren, welches kurze Polypeptide identifiziert, die eine expressionssteigernde Wirkung auf stammzell-assoziierte Gene wie zum Beispiel *OCT4* besitzen. Dazu wurde im Rahmen der Versuche ein vielseitig einsetzbares hochdurchsatzfähiges Screeningsystem in der humanen embryonalen Nierenzelllinie Flp-In® 293 aufgebaut. Die Grundlage bildet dabei die Entwicklung eines tri-funktionellen Reporterkonstrukts. Dieses vereint die Vorzüge von drei Enzymaktivitäten, der Firefly Luciferase, des grün fluoreszierenden Proteins und der Puromycin-N-Acetyl-Transferase (Puromycinresistenz). Darüber hinaus gewährleistet die Verwendung von viralen 2A-Peptiden im Konstrukt eine unimolare Koexpression der einzelnen Reporterenzyme. Im Anschluss wurden stabile isogene Zelllinien generiert, die das Reporterkonstrukt unter Kontrolle des humanen *OCT4* Promotors exprimieren. Zur Identifizierung von expressionsaktivierenden Polypeptiden wurde eine komplexe randomisierte Peptidbibliothek synthetisiert und diese durch retroviralen Gentransfer in die Reporterzelllinien eingebracht.

Sowohl nach Antibiotikaselektion als auch nach Selektion via Duchflusszytometrie (FACS) zeigte sich eine signifikante Reportergeninduktion durch einzelne Kandidaten aus der Peptidbibliothek. Mit der *Rescue PCR* und deren anschließender Sequenzierung wurden die putativen Peptidsequenzen identifiziert. Die Validierungsexperimente mit ausgewählten Varianten der Peptidbibliothek bestätigten als *proof of principle* für beide Selektionsstrategien eine peptid-vermittelte Promotoraktivierung des stammzell-assoziierten Gens *OCT4*. Im Vergleich beider Strategien zeigte sich, dass durch FACS-Selektion in kürzerer Zeit wesentlich mehr putative Targets identifiziert wurden. Zusätzlich konnte der Anteil falsch-positiver Ergebnisse reduziert werden. Das etablierte Screeningverfahren bietet des Weiteren die Möglichkeit zur Untersuchung anderer stammzell-assoziierter Gene wie *NANOG* und *SOX2*. Es stellt somit ein effektives Verfahren zur Identifizierung weiterer putativer Peptidsequenzen aus der Peptidbibliothek dar.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse leisten einen wichtigen Beitrag bei Suche nach reprogrammierungsfördernden Polypeptiden. Neben der Entwicklung von patienten- und krankheitsspezifischen *in vitro* Modellsystemen ist mit Hilfe der Polypeptide auch die Untersuchung grundlegender Mechanismen der Stammzell-Selbsterneuerung und -Differenzierung denkbar.

2 Einleitung

2.1 Stammzellen

Als Stammzellen werden körpereigene Vorläuferzellen definiert, die sich selbst erneuern und in unterschiedliche Zell- und Gewebetypen differenzieren können (Siminovitch et al. 1963).
Erstmalig gelang die Isolierung und Kultivierung dieser Zellen aus Mausembryonen im Jahr 1981 (Evans und Kaufman 1981, Martin 1981). Dabei wurden die murinen embryonalen Stammzellen (mES) aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste entnommen. Darauf aufbauend folgte 1998 die Gewinnung und Vermehrung humaner embryonaler Stammzellen (hES) (Thomson et al. 1998).

Die Klassifizierung der Stammzellen wird anhand ihres Differenzierungspotentials oder der Art der Gewinnung vorgenommen (Smith 2006). Da Stammzellen am Beginn der Embryonalentwicklung auftreten, verfügt eine befruchtete Eizelle (Zygote) über das höchste Differenzierungspotential. Bis zum Vierzell-Stadium sind diese totipotenten Stammzellen in der Lage, sich zu einem kompletten Organismus zu entwickeln, was auch die Bildung von extraembryonalem Gewebe (Plazenta) einschließt (De Miguel et al. 2010).
Mit fortschreitender Differenzierung verlieren Stammzellen jedoch ihr Differenzierungspotential und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. So sind pluripotente Stammzellen noch in der Lage, Zellen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm, Ektoderm) zu bilden, jedoch keinen gesamten Organismus. Die nächste Differenzierungsstufe stellen die multipotenten Stammzellen dar. Sie können sich in verschiedene Zelltypen eines bestimmten Gewebetyps entwickeln. Ein Beispiel dafür sind die hämatopoetischen Stammzellen.
Das niedrigste Potential weisen unipotente Stammzellen auf. Diese Zellen differenzieren sich ausschließlich in Zellen einer Abstammungslinie z.B. Spermatogonien-Stammzellen. Nach finaler Differenzierung zu einem spezifischen Zell- oder Gewebetyp werden die Zellen als nullipotent bezeichnet. Es ist keine Selbsterneuerung mehr möglich (De Miguel et al. 2010, Smith 2006) (Abb. 1).

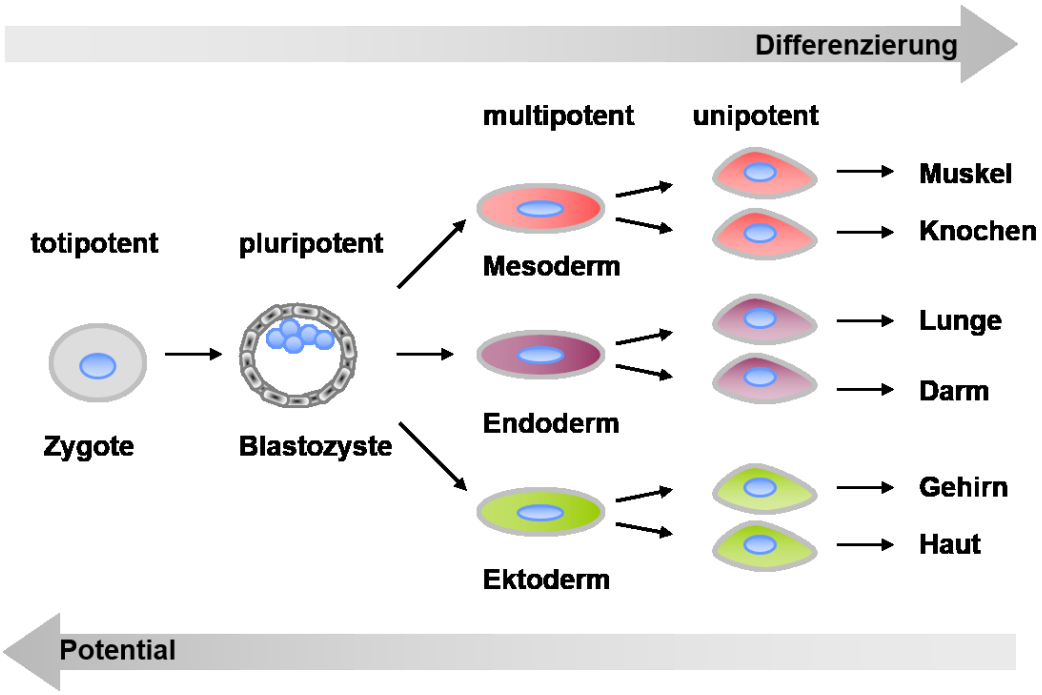

Abbildung 1: Differenzierungspotential von Stammzellen

Embryonale Stammzellen können anhand ihres Differenzierungspotentials klassifiziert werden. Im Verlauf der Differenzierung verlieren die Stammzellen durch asymmetrische Zellteilung fortwährend ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Potenz); modifizierte Abbildung nach (Raff 2003).

Obwohl die molekularen Mechanismen von Selbsterneuerung und Differenzierung Gegenstand intensiver Forschung sind, bleiben im Detail noch viele Fragen offen. Grundlegend basieren die Prozesse auf einer Kombination von unterschiedlichen Faktoren. Zum einen handelt es sich um intrinsische Effekte wie die Regulation der Genexpression durch unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden. In diesem Zusammenhang konnte ein wichtiger Einfluss des *NOTCH*- und *WNT/β-CATENIN*-Signalweges gezeigt werden (Kuhl und Kuhl 2013, Ng und Surani 2011). Zum anderen besitzen extrinsische Faktoren wichtige Regulationsfunktionen. Im Besonderen sind dabei der *transforming growth factor beta* (*TGF-β*) und der *leukemia inhibitory factor* (*LIF*) zu nennen (González Carvajal 2010, Jaenisch und Young 2008, Spradling et al. 2001, Molofsky et al. 2004, Boyer et al. 2005, Cartwright et al. 2005).

Generell basiert die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung auf zwei unterschiedlichen Möglichkeiten der Zellteilung. Einerseits können zwei identische Tochterzellen durch eine symmetrische Zellteilung aus einer Mutterzelle gebildet werden. Daraus leitet sich das „nahezu unbegrenzte“ Wachstums- und

Teilungspotential der Stammzellen ab. Andererseits werden bei einer asymmetrischen Zellteilung aus einer Mutterzelle eine differenzierte Tochterzelle und eine Stammzelle mit vermindertem Differenzierungspotential generiert (Molofsky et al. 2004, Raff 2003).

2.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES) zählen definitionsgemäß zu den pluripotenten Stammzellen. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können sich in Zell- und Gewebetypen aller drei Keimblätter differenzieren. Die aus der inneren Zellmasse von humanen oder murinen Blastozysten isolierten ES sind unter geeigneten Zellkulturbedingungen *in vitro* über einen langen Zeitraum kultivierbar. Diese Zellen zeigen Teratombildung (Keimzelltumore), sind keimbahngängig und in der Lage, nach Injektion in murine Blastozysten chimäre Organismen zu bilden (Evans und Kaufman 1981, Martin 1981, Thomson et al. 1998) (Abb. 2).

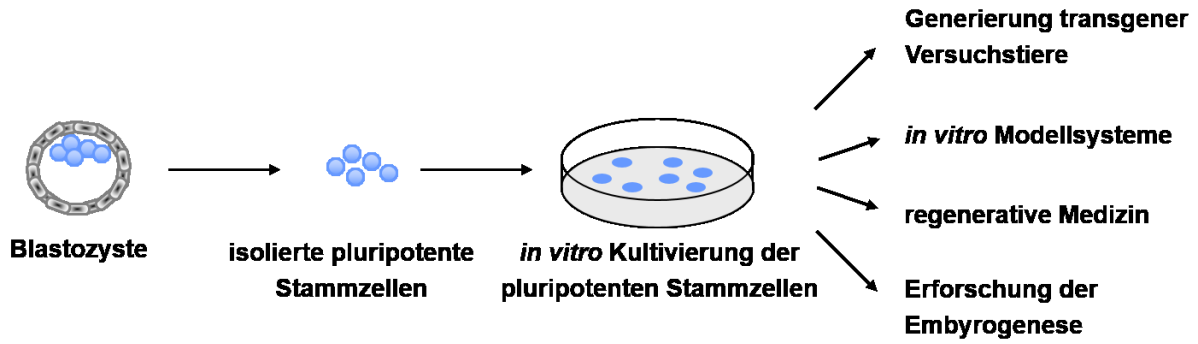

Abbildung 2: Gewinnung und Verwendung pluripotenter Stammzellen *in vitro*
Die aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste isolierten humanen oder murinen embryonalen Stammzellen sind *in vitro* über einen langen Zeitraum kultivierbar und besitzen vielfältige Einsatzmöglichkeiten in der medizinischen Forschung; modifizierte Abbildung nach (www.egbeck.de).

Molekularbiologisch sind ES durch eine Reihe von Faktoren eindeutig zu charakterisieren. Dazu zählen die Aktivität der Telomerase und der alkalischen Phosphatase sowie die Expression des Zelloberflächenantigens *SSEA1* und der

Transkriptionsfaktoren *OCT3/4*, *NANOG*, *C-MYC* und *STAT3* (González Carvajal 2010).
ES besitzen vielfältige Einsatzmöglichkeiten. So werden sie beispielsweise bei der Generierung von genetisch modifizierten transgenen Organismen z.B. Mausstämme verwendet. Dabei stellt das Ein- bzw. Abschalten (Knockin bzw. Knockout) von Genen ein Durchbruch für das Verständnis von humanen Erkrankungen dar (González Carvajal 2010). Darüber hinaus bilden ES die Grundlage für die Etablierung von *in vitro* (Krankheits)-Modellen und die Erforschung der embryonalen Entwicklung. Aufgrund ihres großen Differenzierungspotentials ist eine Verwendung der ES für die regenerative Medizin und die Stammzelltherapie besonders interessant (Lo und Parham 2009, Hochedlinger und Jaenisch 2003, Hochedlinger und Jaenisch 2006, Jaenisch et al. 2004) (Abb. 2).
Der medizinische Einsatz von hES wird durch die Tatsache erschwert, dass ihre Gewinnung die Zerstörung von humanen Embryonen voraussetzt. In Deutschland haben die damit verbundenen ethischen Bedenken zu einer kontroversen Debatte geführt. Daher wurden der Zugang zu hES und die Arbeit mit ihnen durch das Stammzell- und Embryonenschutzgesetz stark eingeschränkt (Lo und Parham 2009, González Carvajal 2010).

2.1.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen (AS) (somatische Stammzellen) kommen in vielen Geweben im ausgewachsenem Organismus vor und sind multipotent (Alonso und Fuchs 2003, Neuringer und Randell 2004). Sie weisen im Vergleich zu ES ein geringeres Differenzierungs- und Proliferationspotential auf und sind ethisch relativ unbedenklich verfügbar (Hellwig 2011). Ein Beispiel für eine erfolgreiche medizinische Anwendung von AS sind hämatopoetische Stammzellen. Diese werden bereits bei der Therapie von Blutbildungsstörungen z.B. Leukämie eingesetzt und bilden seither die am besten erforschte Gruppe der AS (Uozumi 2010, Utsunomiya et al. 2001, Majeti et al. 2007, Raff 2003).

2.2 Reprogrammierung von somatischen Zellen

2.2.1 Reprogrammierungsverfahren

Die Differenzierung von Zellen galt in der Entwicklungsbiologie lange Zeit als irreversibler Prozess. Das bedeutet, dass die Zellen während ihrer Entwicklung fortwährend die Fähigkeit der Selbsterneuerung und ihr Differenzierungspotential verlieren. Mit Hilfe der Zellkerntransfer- sowie der Zellfusionsmethode wurde es möglich, somatische Zellen zu reprogrammieren und somit die Unumkehrbarkeit der Differenzierung zu widerlegen (Blau et al. 1983, Yamanaka und Blau 2010) (Abb. 3). Im Falle des Zellkerntransfers werden die Zellkerne von somatischen Zellen (Spenderzellen) in entkernte Oozyten (Empfängerzellen) transplantiert. Auf diesem Wege konnten differenzierte Zellen reprogrammiert und daraus mit dem Spender genetisch identische, lebensfähige Organismen generiert werden. Das Verfahren wird umgangssprachlich als Klonen bezeichnet (Yamanaka und Blau 2010, Wilmut et al. 1997).

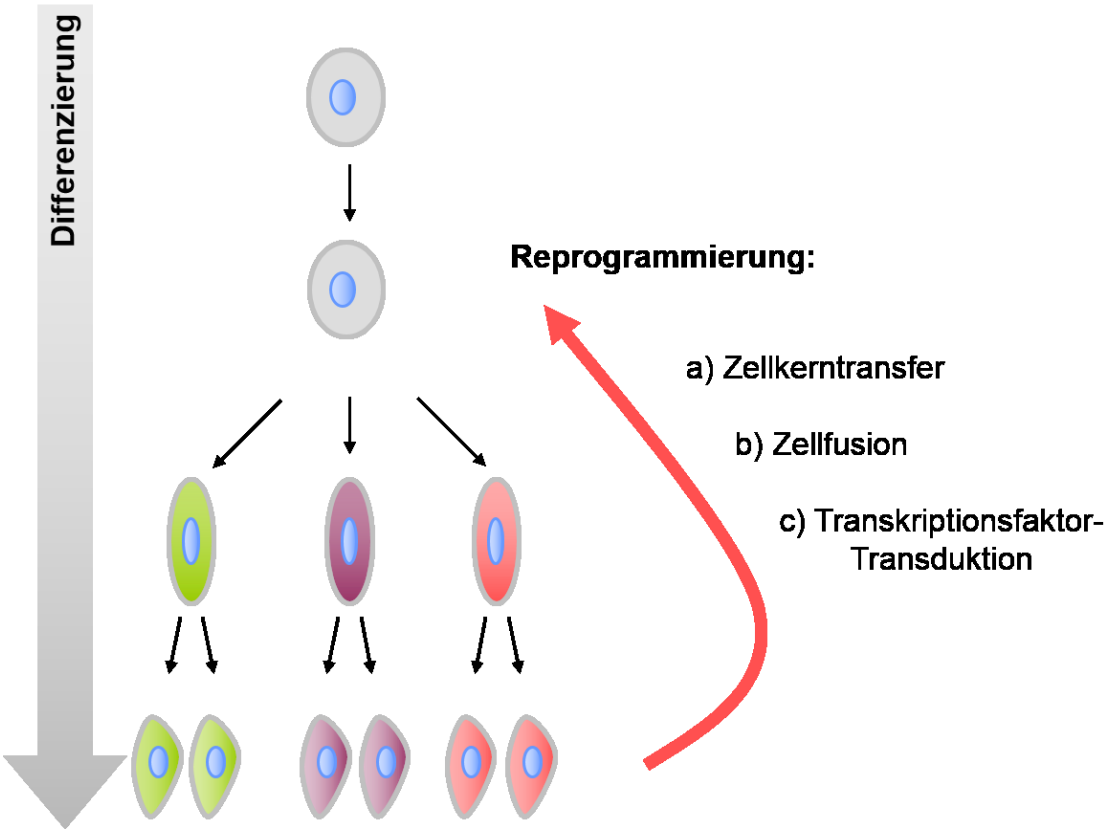

Abbildung 3: Zelldifferenzierung und Reprogrammierung

Im Verlauf der Differenzierung verlieren die Stammzellen durch asymmetrische Zellteilung fortwährend ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihre Potenz. Die Umkehrbarkeit des Prozesses konnte durch unterschiedliche Reprogrammierungsverfahren gezeigt werden: a) Zellkerntransfer, b) Zellfusion und c) Transduktion von Transkriptionsfaktoren; modifizierte Abbildung nach (Yamanaka und Blau 2010, Raff 2003).

2.2.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Im Jahr 2006 wurden die vier Transkriptionsfaktoren (TF) *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* und *C-MYC* identifiziert, welche für die Reprogrammierung von somatischen Zellen hinreichend sind. Nach ektopischer Expression dieser TF durch retrovirale Transduktion war es möglich, aus embryonalen und adulten murinen Fibroblasten pluripotente Stammzellen zu generieren. Diese *embryonic like stem cells* zeigen mit ES vergleichbare morphologische Eigenschaften und eine Expression von stammzell-spezifischen Markergenen. Daher bezeichnet man sie als murine induzierte pluripotente Stammzellen (miPS). Analog zu ES sind die miPS fähig, Zellen aller drei Keimblätter und Teratome auszubilden (Takahashi und Yamanaka 2006). Des Weiteren können die miPS nach Injektion in murine Blastozysten chimäre

Mäuse generieren. Zusätzlich konnte die Keimbahngängigkeit für diese Zellen nachgewiesen werden (Okita et al. 2007, Takahashi et al. 2007).
Im Jahr 2007 gelang dann auch die Reprogrammierung von humanen adulten Fibroblasten durch dieses Verfahrens. Die humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS) sind ebenso in der Lage, Zellen aller drei Keimblätter und Teratome auszubilden. Darüber hinaus zeigen sie die Expression embryonaler stammzell-spezifischer Oberflächenantigene und Markergene sowie eine erhöhte Telomeraseaktivität. (Okita et al. 2007, Takahashi et al. 2007). Im weiteren Verlauf der Forschung war es möglich, neben Fibroblasten auch andere murine und humane somatische Zellen zu reprogrammieren und die iPS *in vitro* in eine Vielzahl verschiedener Zell- und Gewebetypen zu differenzieren (Dey und Evans 2011, Song et al. 2011, Zhou et al. 2008, Efe et al. 2011, Aasen et al. 2008, Yu et al. 2007). Ferner konnten weitere TF und deren alternative Kombinationen für die Reprogrammierung wie z.B. *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* und *LIN28* identifiziert werden (Yu et al. 2007, Takahashi et al. 2007).

Eine weiterführende Charakterisierung von hiPS und hES zeigte neben großen Übereinstimmungen auch distinkte Unterschiede (Dey und Evans 2011, Drews et al. 2012). So ergaben genomweite Expressionsstudien unterschiedliche Expressionsprofile. Zudem wiesen die analysierten hiPS- und hES-Linien während der *in vitro* Kultivierung eine zeitliche Veränderung der Expressionsmuster (Zellalterung) auf (Dey und Evans 2011, Chin et al. 2009).

2.3 Mechanismen der Reprogrammierung

Der Prozess der Reprogrammierung erfordert großes experimentelles Knowhow. Er ist äußerst langwierig und ineffizient. Die Erforschung der grundlegenden Mechanismen und die Optimierung des Reprogrammierungsprozesses sind daher eine essentielle Voraussetzung für die mögliche therapeutische Verwendung der hiPS (Izpisua Belmonte et al. 2009, Takahashi und Yamanaka 2006, Yamanaka 2009, Takahashi et al. 2007, Yamanaka und Blau 2010).

2.3.1 Molekulare Mechanismen

Die Transkriptionsfaktoren *OCT4* (*Octamer-binding transcription factor 4)* ebenfalls bekannt als *POU5F1* (*POU class 5 homeobox 1*), *SOX2* (*sex-determing region Y-Box2*) und das Homöoboxprotein *NANOG* (*Tir nan Og*; nach einer irischen Sage „Land der ewigen Jugend“) sind Schlüsselelemente bei der Regulierung der Selbsterneuerung und Differenzierung. Sie bilden ein stammzell-assoziiertes Kerntranskriptionsnetzwerk (Ahfeldt 2012, Eminli 2010, Niwa et al. 2000, Mitsui et al. 2003, Avilion et al. 2003). Wenn in somatischen Zellen ihre Expression induziert wird, sind sie in der Lage, diese zu reprogrammieren und die Pluripotenz zu erhalten. Im Gegensatz dazu führt eine Expressionsinhibition der drei TF zur Differenzierung der Zellen (Abb. 4). Jeder der drei TF kann seinen eigenen Promotor (pr) sowie die der anderen beiden binden und deren Expression induzieren. Diese Autoregulation führt somit zu einer synergistischen Expression der drei Gene (Boyer et al. 2005, Jaenisch und Young 2008, Babaie et al. 2007, Ahfeldt 2012).

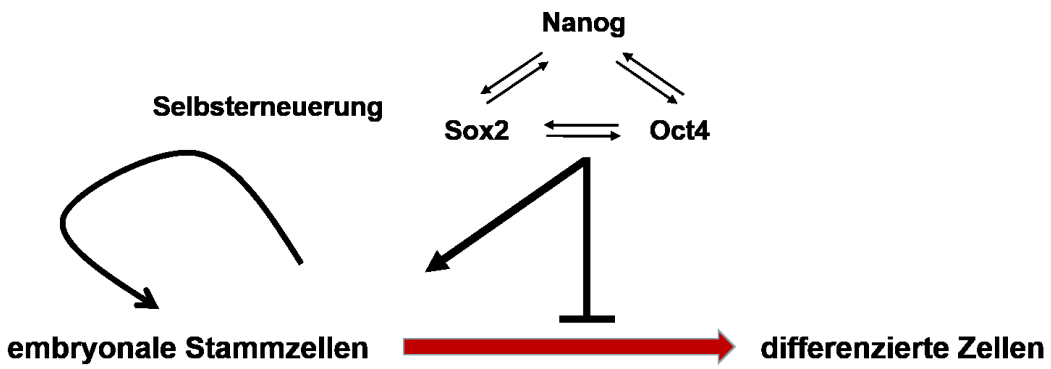

Abbildung 4: Schlüsselregulatoren der Selbsterneuerung und Differenzierung
Die Transkriptionsfaktoren *OCT4*, *NANOG* und *SOX2* bilden ein stammzell-assoziiertes Kerntranskriptionsnetzwerk, welches eine Schlüsselfunktion bei der Regulation von Selbsterneuerung und Differenzierung besitzt. Die Inhibition der Expression dieser Faktoren führt zur Differenzierung der Zellen; modifizierte Abbildung nach (Ahfeldt 2012, Eminli 2010, Li et al. 2012).

Neben den bereits genannten Schlüsselregulatoren spielen die TF *C-MYC* und *KLF4* (*kruppel-like factor 4*) eine wichtige Rolle bei der Reprogrammierung von somatischen Zellen. Beide Faktoren wurden im Zusammenhang mit der Regulation

des Zellzyklus und des *P53/P21*-Signalwegs beschrieben (Nakagawa et al. 2008, Okita und Yamanaka 2011, Li et al. 2005, Cartwright et al. 2005, Zhang et al. 2000).
Der *P53/P21*-Signalweg hat eine zentrale Bedeutung bei der Regulierung des Zellzyklus. So konnte im Detail gezeigt werden, dass die Expressionsinhibition des Tumorsuppressorgens *P53* eine Erhöhung der Reprogrammierungseffizienz und der Zellteilungsrate zur Folge hat. Demnach wäre die Anzahl der abgelaufenen Zellteilungen für die Geschwindigkeit und die Effizienz der Reprogrammierung entscheidend. Analog zu *P53* werden auch für den TF *LIN28* zellteilungsabhängige Effekte bei der Reprogrammierung beschrieben (Okita und Yamanaka 2011, Hanna et al. 2009, Hong et al. 2009, Martel et al. 2006, Drews et al. 2012).
Obwohl mittlerweile viele molekulare Mechanismen der Reprogrammierung bekannt sind, bleibt z.B. die Frage ungeklärt, ob jede somatische Zelle reprogrammierbar ist. Grundsätzlich könnten entweder alle oder nur einzelne Subpopulationen von somatischen Zellen reprogrammiert werden (Hanna et al. 2009).

2.3.2 Epigenetische Einflüsse

Die Ergebnisse vieler Studien legen den Schluss nahe, dass epigenetische Einflüsse wie DNA-Methylierungen (*imprinting*) und Histonmodifikationen bei der Reprogrammierung von essentieller Bedeutung sind. Der Vergleich des DNA-Methylierungsstatus von stammzell-assoziierten Genen zeigte für Fibroblasten eine starke Methylierung der Promotorbereiche. Dagegen liegen die Promotoren bei hES und hiPS demethyliert vor. Diese „Löschung“ des epigenetischen Status in den zu reprogrammierenden Zellen führt somit zu einer verstärkten Expression der Gene (Jaenisch und Young 2008, Okita und Yamanaka 2011, Guttman et al. 2009). Die Frage, ob die Demethylierung der Promotorbereiche eine Ursache oder die Folge der Reprogrammierung ist, konnte bislang noch nicht hinreichend geklärt werden. Weiterhin zeigten die Methylierungsmuster von hES und hiPS neben großen Übereinstimmungen auch distinkte Unterschiede (Meissner et al. 2008, Hochedlinger und Plath 2009, Molofsky et al. 2004).

2.4 Strategien zur iPS Generierung

2.4.1 Reprogrammierung durch virale Transkriptionsfaktorinduktion

In den zuerst von Shinya Yamanaka beschriebenen Reprogrammierungsversuchen erfolgte der Gentransfer der TF mit durch retrovirale Transduktion (Takahashi et al. 2007, Takahashi und Yamanaka 2006, Yamanaka und Blau 2010). Mit dieser Methode können Gene in Zielzellen stabil und mit hoher Effizienz exprimiert werden. Bei der retroviralen Transduktion werden die Transgene an einer zufälligen Stelle im Genom der Zielzellen integriert. Durch die randomisierte genomische Integration besitzen die Zellen ein hohes onkologisches Gefahrenpotential und sind somit für einen klinischen Einsatz nicht zu verwenden. Aufgrund dessen wurde nach alternativen Strategien zur Reprogrammierung und deren Optimierung gesucht (Shao und Wu 2010) (Abb. 5).
Für diese Optimierung sollte die Anzahl der genomischen Integrationen während des Prozesses reduziert werden. Dazu wurden die Transgene mittels eines einzelnen polycistronischen retroviralen Expressionsvektors in die Zielzellen eingebracht (Shao et al. 2009, Carey et al. 2009). In weiteren Versuchen konnte die Reprogrammierung mit Hilfe von adeno- und sendaiviralen Expressionsvektoren erreicht werden (Wolkowicz et al. 2005, Wolkowicz et al. 2004, Hotta et al. 2009, Yang et al. 2008, Hitoshi et al. 2003). Bei diesen Expressionssystemen werden die TF effizient in den Zielzellen exprimiert, aber im Gegensatz zu retro-/lentiviralen Systemen nicht ins Genom der Wirtszellen integriert (Shao und Wu 2010, Hotta et al. 2009, Nishimura et al. 2011).

2.4.2 „Virusfreie“ Reprogrammierung

Bei der „virusfreien“ Reprogrammierung erfolgt die Expressionsinduktion der TF durch Transfektion von Plasmiden oder RNA-Molekülen (Abb. 5). Da Nukleinsäuren in den Zellen schnell degradiert werden, ist die Expression der Transgene zeitlich begrenzt. Um die daraus resultierenden negativen Effekte zu minimieren, kamen in den Versuchen serielle (mehrfache) Transfektionen oder synthetisch modifizierte

RNA-Moleküle zum Einsatz. Auf diesem Wege sind Zellen in ca. zwei Wochen reprogrammierbar. Die Reprogrammierungseffizienz ließ sich um den Faktor 100 steigern (Kaji et al. 2009, Dey und Evans 2011, Warren et al. 2010, Okita et al. 2008, Okita et al. 2010, Ahfeldt 2012).
Analog zum Einsatz von Nukleinsäuren ist auch die Verwendung von rekombinanten Proteinen (der Transkriptionsfaktoren) für die Generation von iPS möglich (Abb. 5). Dabei wird kein genetisches Material in die Zellen eingebracht (Zhou et al. 2009, Dey und Evans 2011, Kim et al. 2009).

2.4.3 *Small molecules* und miRNA

Small molecules und miRNA besitzen ein großes Potential zur Minimierung des zeitlichen Aufwandes und zur Optimierung der Reprogrammierungseffizienz (Yang et al. 2011, Huangfu et al. 2008, Shi et al. 2008a) (Abb. 5).
Die Stoffklasse der *small molecules* ist bei der Entwicklung von neuen Wirkstoffen und Medikamenten von großem Interesse. Es handelt sich um kleine chemische Moleküle, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse regulieren können (Ichida et al. 2009, Shi et al. 2008b). Es konnten z.B. in luciferase-basierten Reportergen-Assays (RGA) aus komplexen *small molecule* Bibliotheken Verbindungen identifiziert werden, die eine *OCT4* Expression induzieren (Li et al. 2012). Darüber hinaus führte die Kombination von klassischen Reprogrammierungsstrategien (ektopische Expression der Transkriptionsfaktoren) mit dem Einsatz von *small molecules* zu einer signifikanten Erhöhung der Reprogrammierungseffizienz (Ichida et al. 2009, Huangfu et al. 2008, Li et al. 2012).
MiRNA sind ca. 20 Nt lange RNA-Moleküle, die posttranskriptionell die Genexpression modulieren (Yang et al. 2011). Eine monokausale miRNA-vermittelte Reprogrammierung von somatischen Zellen ist in der Literatur umstritten (Yang et al. 2011).
Jedoch konnten analog zu den *small molecules* auch miRNA (z.B. miR-21 und miR-29) identifiziert werden, die in Kombination mit klassischen Reprogrammierungsstrategien einen positiven Effekt auf die Reprogrammierung von somatischen Zellen besitzen (Yang et al. 2011).

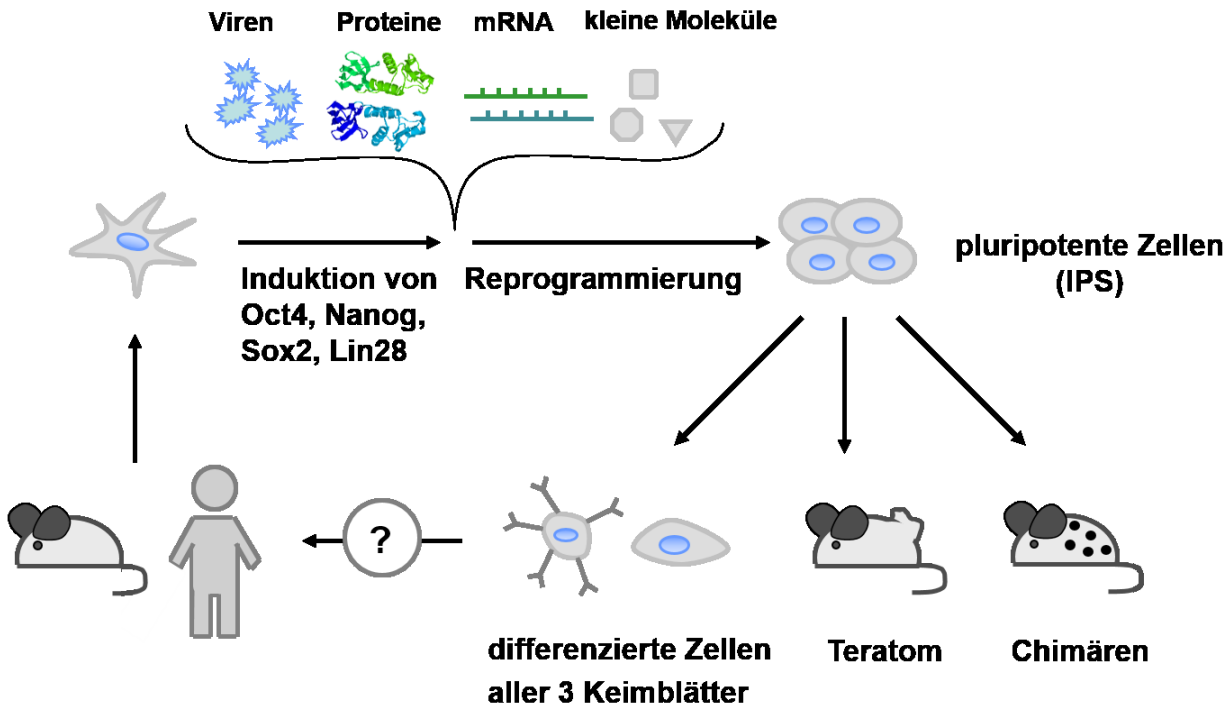

Abbildung 5: Direkte Reprogrammierung somatischer Zellen

Murine und humane somatische Zellen können durch Expressionsinduktion von stammzell-assoziierten Transkriptionsfaktoren zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) reprogrammiert werden. Die Reprogrammierung erfolgt durch Viren, Nukleinsäuren sowie Proteinen der Transkriptionsfaktoren oder unter Verwendung von *small molecules*. Die iPS können in Zellen aller drei Keimblätter differenziert werden, zeigen Teratomenbildung und sind in der Lage, chimäre Organismen zu bilden; modifizierte Abbildung nach (Dey und Evans 2011, Yamanaka und Blau 2010).

2.5 Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen

2.5.1 Grundlagenforschung

Die direkte Reprogrammierung von somatischen Zellen gewährleistet für die Forschung einen im Vergleich zu ES ethisch unbedenklicheren und leicht verfügbaren Zugang zu pluripotenten Zellen. Da es möglich ist, die iPS in nahezu jeden Zell- und Gewebetyp *in vitro* zu differenzieren, konnte mit ihrer Hilfe eine Vielzahl von humanen *in vitro* Krankheitsmodellen erstellt werden (Abb. 6).

Zum Beispiel wurden Modellsysteme zur Erforschung von Parkinson, Alzheimer, Hepatitis C und Trisomie 21 unter Verwendung von iPS etabliert (Drews et al. 2012,

Grskovic et al. 2011, Park et al. 2008). Diese Systeme sind unter anderen für toxikologische Studien (Medikamentverträglichkeitsstudien) und für die Entwicklung neuer pharmazeutischer Medikamente von großer Bedeutung. Die Erzeugung von pluripotenten Zellen macht auch die Generierung von patienten-spezifischen *in vitro*-Testsystemen denkbar. Eine patienten-spezifische Erprobung von Medikamenten auf ihre Wirksamkeit und Nebenwirkungen wäre von unschätzbarem Wert für Medizin und Forschung (Drews et al. 2012, Yamanaka 2009, Park et al. 2008, Jang et al. 2012) (Abb. 6).

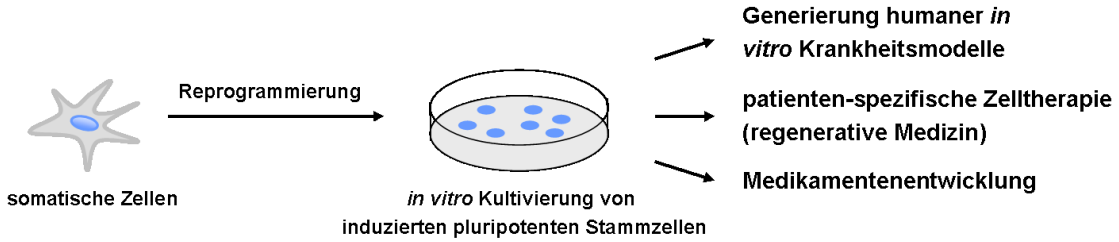

Abbildung 6: Gewinnung und Verwendung induzierter pluripotenter Stammzellen
Somatische Zellen (Fibroblasten) können zu induzierten pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden und sind *in vitro* über einen langen Zeitraum kultivierbar. Diese Zellen besitzen vielfältige Einsatzmöglichkeiten in der medizinischen Forschung; modifizierte Abbildung nach (Yamanaka und Blau 2010).

2.5.2 Regenerative Medizin

Die Generierung von patienten-spezifischen iPS ist eine wichtige Voraussetzung für die regenerative Medizin und die Stammzelltherapie (Okano et al. 2013, Takahashi und Yamanaka 2006, Takahashi et al. 2007). Im Idealfall soll durch Verwendung von spendereigenen (autologen) Ausgangszellen eine Immunreaktion, die zur Abstoßung der transplantierten Zellen führt, verhindert werden (Okano et al. 2013, Zhao et al. 2011). Damit stellen iPS als Ausgangsmaterial für das *tissue engineering* zur Züchtung und Transplantation von Hautzellen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Weiterhin könnten mit Hilfe von patienten-spezifischen iPS eine Vielzahl anderer Gewebe oder Organe generiert und im Anschluss dem Patienten transplantiert werden (Zhang et al. 2011, Daley und Scadden 2008, Park et al. 2008, Drews et al. 2012). Diese Form der Therapie wäre ein Durchbruch für die

Behandlung einer ganze Reihe von Krankheiten wie z.B. neurodegenerative Störungen, Leukämie und kardio-vaskuläre Erkrankungen (Nelson et al. 2009, Zhang et al. 2011). Die Verfahren sind jedoch technisch bei Weitem noch nicht ausgereift. Momentan wäre eine klinische Anwendung der iPS mit unkalkulierbaren Risiken verbunden, da der Nachweis der dauerhaften genomischen Integrität der iPS noch aussteht. Weiterhin kann ein mögliches onkologisches Potential der Zellen nicht ausgeschlossen werden. Erschwerend kommt hinzu, dass in Tierversuchen eine gewisse Immunogenität der iPS gezeigt wurde (Humpherys et al. 2001, Okano et al. 2013). Dennoch bleiben personalisierte Stammzelltherapien eine überaus interessante Perspektive für die Forschung in der Zukunft.

2.6 Peptidaptamere und randomisierte Peptidbibliotheken

Peptidaptamere (Pa) sind bis zu 20 Aminosäuren (As) lange Polypeptide (Pp). Ebenso wie die *small molecules* bilden Peptidaptamere eine neue Stoffklasse bei der Entwicklung von therapeutisch wirksamen Substanzen z.B. in der Krebstherapie (Borghouts et al. 2005, Kunz et al. 2006). Außerdem finden Pa in der Grundlagen- und angewandten Forschung vielseitigen Einsatz (Watt 2009, Seigneuric et al. 2011) (Tab. 1).

Biologisch aktive Pa werden aus einer randomisierten Peptidbibliothek identifiziert. Sie sind in der Lage, bestimmte Zielstrukturen (Targets) unter zellulären Bedingungen zu erkennen und ihre Funktion zu beeinflussen (Colas et al. 1996, Colas 2000, Hoppe-Seyler et al. 2004). Mit ihrer Hilfe können Proteine oder sogar einzelne Proteinfunktionen selektiv *in vivo* manipuliert werden. In den meisten Fällen basiert die Selektion auf einer Veränderung eines zellulären Phänotyps (Borghouts et al. 2005, Kunz et al. 2006, Gibert et al. 2011, Nouvion et al. 2007, Nagel-Wolfrum et al. 2004, Hoppe-Seyler et al. 2001, Buerger et al. 2003).

Tabelle 1: Einsatzgebiete der Peptidaptamere (Hoppe-Seyler, Crnkovic-Mertens et al. 2001)

Grundlagenforschung	**angewandte medizinische Forschung**
funktionelle Proteomics	Gentherapie
„nicht-klassische“ Antikörper und „Gen-*knockouts*“	peptid-basierte Medikamente
Protein-Protein-Interaktion	„nicht-peptidische“ Mimetika
Identifizierung biologisch aktiver Substanzen	Validierung biologisch aktiver Substanzen
Signaltransduktionsanalysen	

Generell besitzen Pa eine hohe Selektivität und Spezifität. Das ermöglicht die Entwicklung von hochspezifischen Medikamenten mit geringen toxischen Nebenwirkungen (Borghouts et al. 2005, Kunz et al. 2006). Ferner ist ein Einsatz als Alternative zu klassischen Genknockout-Technologien und Antikörpern beschrieben (Davis et al. 2009). Die Identifizierung von biologisch aktiven Pa erfordert die Generierung und das Screening von hochkomplexen, randomisierten Peptidbibliotheken. Da solche Screenings in wenigen Wochen durchführbar sind, bringen sie eine große Zeitersparnis im Vergleich zu den klassischen Verfahren. Darüber hinaus sind Pa wichtige Werkzeuge für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und neuen Signalwegen (Peelle et al. 2001, Colas 2000, Baines und Colas 2006, Paulmurugan und Gambhir 2005, Hoppe-Seyler et al. 2001, Dar 2005).

2.6.1 Kombinatorische biologische Bibliotheken

Biologische Bibliotheken werden als Pool von Mikroorganismen definiert, die unterschiedliche Polypeptide (Pp) exprimieren. Jeder einzelne Klon (Mikroorganismus) trägt dabei im Idealfall die DNA-Sequenz für genau ein Polypeptid der Bibliothek (Mersich und Jungbauer 2008). Die Herstellung der Bibliothek beginnt mit dem Design der codierenden DNA-Sequenzen. Nach der Generierung erfolgen der virale Transfer der Bibliothek und das Screening nach biologisch aktiven Polypeptiden (Mersich und Jungbauer 2008).

2.6.2 Peptid-Display-Methoden

Das Verfahren zur Identifizierung von biologisch aktiven Pa wird als „Peptid-Display“ bezeichnet. Bisher sind eine Reihe unterschiedlicher Anwendungen etabliert wie z.B. das *in vitro* Ribosomen-Display. In pro- und eukaryotischen Zellen sind ebenfalls eine Reihe von Methoden entwickelt worden. Darunter befinden sich das Bakterien- und Phagen-Display (*phage display*) sowie das *Yeast two Hybrid System* (Mersich und Jungbauer 2008). Eines der bekanntesten prokaryotische Screeningverfahren ist das Phagen-Display (Mersich und Jungbauer 2008). Mit seiner Hilfe können große und komplexe Peptidbibliotheken schnell durchsucht werden (Komplexität 10^9 bis 10^{10} Peptide). Das Verfahren basiert auf der Interaktion von randomisierten Polypeptiden mit extrazellulären Proteinen. Dabei werden die Zielproteine (Targets) auf der Oberfläche von dem filamentösen Bakteriophagen M13 präsentiert und so mögliche Interaktionspartner aus der Bibliothek identifiziert (Mersich und Jungbauer 2008, Simons et al. 1981, Hancock et al. 2009, Smith 1985) (Tab. 2).
In eukaryotischen Zellen wurde das *Yeast two Hybid System* etabliert. Diese Technik ist vor allem für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen geeignet. Mittels des daraus abgeleiteten Hefe-Displays können ebenfalls große biologische Bibliotheken untersucht werden (Tab. 2). Von allen beschriebenen Screeningverfahren existieren eine Vielzahl unterschiedlicher Variationen und Weiterentwicklungen (Borghouts et al. 2005, Hamdi und Colas 2012).

Tabelle 2: Peptid-Display-Methoden (Mersich und Jungbauer 2008)

	Phagen-Display	**Bakterien-Display**	**Hefe-Display**	**Säugerzellen-Display**
maximale Bibliotheksgröße	$<10^{11}$	10^9	10^8	10^8
Expressionswirt	Prokaryot	Prokaryot	Hefezellen	Säugetierzellen
Längenrestriktion der Bibliothek	ja	nein	nein	nein
Proteinfaltung	nicht nativ	nicht nativ	nativ	nativ
posttranslationelle Modifikationen	nein	nein	ja / nein	ja

Die Entwicklung neuer Wirkstoffe und Medikamente zur Behandlung von humanen Erkrankungen ist von besonderem Interesse. Daher sind auch für Säugetierzellen eine Reihe unterschiedlicher Peptid-Display-Methoden beschrieben. Hierbei basiert das Screening komplexer biologischer Bibliotheken meist auf der definierten Veränderung eines zellulären Phänotyps.
Diese Verfahren kommen bei der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und Signaltransduktionsnetzwerken zum Einsatz (Buerger et al. 2003, Nagel-Wolfrum et al. 2004, Dar 2005). So konnten am Beispiel des *ERBB2* Rezeptors Polypeptide identifiziert werden, die durch Interaktion mit bestimmten Domainen die Rezeptorfunktionen beeinflussen (Kunz et al. 2006).
Weiterhin wurde in humanen HeLa-Zellen (humane Zelllinie eines Zervixkarzinoms) ein Peptid-Displaysystem etabliert. Mit dessen Hilfe gelang die Ermittlung von kurzen Polypeptiden, die zu einer peptid-vermittelten Taxolresistenz der Zellen führen.
Diese Befunde sind besonders im Hinblick auf die Entwicklung von Medikamentenresistenzen interessant und liefern neue Einblicke in die beteiligten Signalwege (Xu et al. 2001, Kunz et al. 2006).

Die Verwendung der Peptid-Display-Methoden erfordert keine vorherigen Kenntnisse der beteiligten Signalwege und ist somit einfach durchführbar (Peelle et al. 2001, Xu et al. 2001). Die Durchführung von Screeningversuchen in Säugetierzellen erfordert einen effizienten Transfer der Peptidbibliothek sowie robuste und sensitive Detektionssysteme. In vielen Fällen erfolgt der Gentransfer der Peptidbibliotheken mittels lenti- oder retroviraler Transduktion (Hitoshi et al. 2003, Wolkowicz et al. 2005, Wolkowicz et al. 2004, Kitamura et al. 1995, Xu et al. 2001).
Die Pp können entweder in freier Form oder in ein Gerüstprotein integriert vorliegen. Im Verlauf der Zeit wurden unterschiedliche Gerüstproteine beschrieben, wie grün fluoreszierendes Protein (GFP) und Thioredoxin A. Gerüstproteine ermöglichen die Präsentation der Peptide in einer bestimmten und relativ starren Konformation an seiner Oberfläche (Borghouts et al. 2005, Peelle et al. 2001, Davis et al. 2007). Dem gegenüber besitzen freie Polypeptide eine höhere Flexibilität und können in mehreren unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Es ist zu bemerken, dass keines der beiden Verfahren grundsätzlich vorzuziehen ist und die Verwendung von der jeweiligen Fragestellung abhängt (Borghouts et al. 2005, Peelle et al. 2001).

2.7 Zellbasierte Reportergenassays in Hochdurchsatzscreenings

Die Identifizierung neuer biologisch aktiver Substanzen ist besonders in der pharmakologischen Forschung und in den Lebenswissenschaften von Interesse. In vielen Fällen handelt es sich dabei um zellbasierte Systeme, bei denen mit Hilfe von Reportergenen nach erfolgversprechenden Substanzen gesucht wird. Zellbasierte Reportergenassays (RGA) finden ebenfalls bei der Untersuchung von Genregulation und Genexpression sowie bei Translations- und Proteinaktivitätsstudien vielseitigen Einsatz. Die Verwendung von RGA in Hochdurchsatzscreenings (HTS) bietet besonders gute Erfolgsaussichten (Jackson und Harrington 2005, Hancock et al. 2009, Kain und Ganguly 2001). In solchen Versuchen können eine große Anzahl von Substanzen auf ihre biologische, chemische und genetische Wirkung untersucht werden. Die Etablierung dieser Testsysteme erfordert einen einfachen und robusten Versuchsaufbau, eine schnelle Durchführung sowie eine hohe Sensitivität bei geringen Kosten. Die Kostenoptimierung erfordert eine automatisierte Durchführung der Versuche in miniaturisiertem Maßstab (Davis et al. 2002, Siebring-van Olst et al. 2013, Patel et al. 2012).

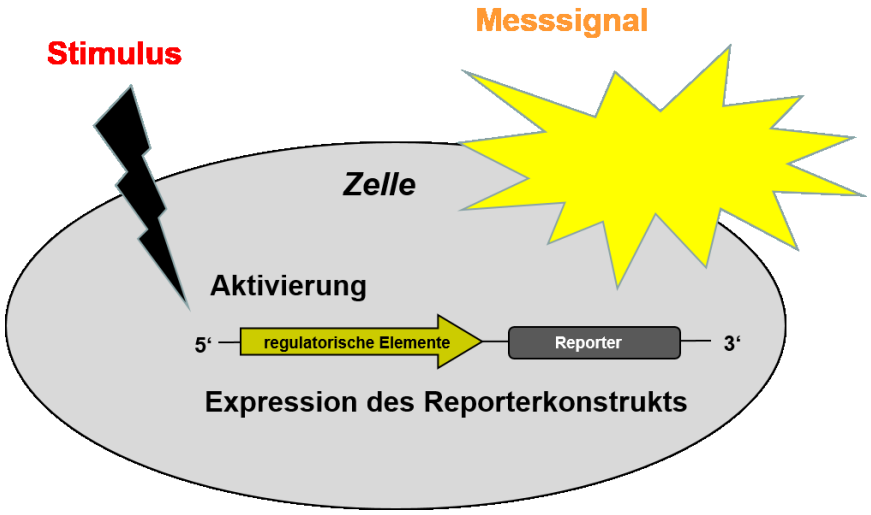

Abbildung 7: Funktionsweise zellbasierter Reportergenassays

Schematisch dargestellt ist die Funktionsweise von zellbasierten Reportergenassays. In den Zellen wird das Reporterkonstrukt, bestehend aus den regulatorischen Abschnitten des Zielgens und dem Reportergen, exprimiert. Nach Stimulation der Zellen kann die Aktivierung des Reporters durch ein detektierbares Messsignal quantifiziert werden; modifizierte Abbildung nach (Jackson und Harrington 2005).

2.7.1 Reportergene und Selektionsmarker

Reportergene kodieren definitionsgemäß für Enzyme oder Farbstoffe, die nicht natürlich in den Zellen vorkommen. Sie sollten nicht toxisch für die Zellen sowie leicht zu detektieren und zu quantifizieren sein. Bei der Durchführung von RGA werden diese Reporterenzyme unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen eines Zielgens exprimiert (Abb. 7). Die Aktivität des Reportergens ist somit ein Ersatzmaß für die Expression des zu untersuchenden Zielgens (Fan und Wood 2007, Hargrove und Schmidt 1989, Kain und Ganguly 2001). Die Kombination aus zellbasierten RGA und automatisierten HTS findet in der pharmakologischen Forschung bei der Identifikation neuer aktiver Substanzen (potentielle Medikamente) vielseitige Verwendung. Mit Hilfe dieser Screeningsysteme konnten große Bibliotheken von *small molecules* zur Entwicklung von antiviralen Medikamenten der nächsten Generation und zur Herstellung von iPS gescreent werden (Patel et al. 2012, Beyleveld et al. 2013).

Ein weit verbreitetes Reporterenzym ist die Firefly Luciferase (*Photimus pyralis*). Sie katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung vom Substrat Luziferin D zu Oxyluziferin. Diese Reaktion setzt Photonen frei, die als Licht im Luminometer (Spektralmaximum bei 560 nm) detektiert werden können (de Wet et al. 1987). Die Messung des emittierten Lichtes erlaubt eine schnelle und sensitive Quantifizierung der Genexpression mit hoher dynamischer Breite. Aus diesem Grund eignet sich die Luciferase für ein zellbasiertes HTS (Siebring-van Olst et al. 2013, Davis et al. 2002, Fan und Wood 2007). Darüber hinaus sind andere Reportersysteme beschrieben wie z.B. die Renilla Luciferase, die β-Galaktosidase und die alkalische Phosphatase (AP) (Jackson und Harrington 2005, Fribley et al. 2011, Hancock et al. 2009, Chen et al. 2007, Patel et al. 2012, Kain und Ganguly 2001).

Fluoreszierende Proteine, wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) werden ebenfalls als Reporter- und Selektionsproteine verwendet. Das GFP wurde in der Qualle *Aequorea victoria* beschrieben und zeigt eine grüne Fluoreszenz nach Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht (Inouye und Tsuji 1994).

In der Entwicklungsbiologie sind fluoreszierende Proteine unverzichtbare Werkzeuge (Zhang et al. 1996). Zum Beispiel kann die Embryonalentwicklung durch GFP-markierte Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden (Krueger et al. 2011). Außerdem sind fluoreszierende Proteine besonders für

durchflusszytometrische Methoden (FACS - *fluorescence-activated cell sorting*) prädestiniert (Mao et al. 2013).
Als Selektionsmarker können Antibiotika verwendet werden. In Säugetierzellen kommen u.a. die Selektionsantibiotika Hygromycin B und Puromycin zum Einsatz. Puromycin führt zur Termination der Translation und hat somit die Hemmung der Protein-Biosynthese zur Folge. Die Puromycin-N-Acetyl-Transferase (Puromycinresistenz) wurde zuerst in *Streptomyces alboniger* beschrieben. Die toxischen Effekte des Puromycins werden durch eine Amino-Acetylierung des Puromycin-Tyrosinylrestes deaktiviert (Gomez Lahoz et al. 1991, Gomez Lahoz et al. 1992).
Multi-funktionelle Reporterkonstrukte ermöglichen unterschiedliche Screening- und Selektionsstrategien und damit einen variablen Einsatz der Screeningsysteme.
Für einen gleichwertigen Einsatz der einzelnen Reporterenzyme ist die simultane und äquimolare Expression der Enzyme essentiell. Dazu werden u.a. Fusionsproteine, IRES Elemente (interne ribosomale Eintrittsstelle) und alternativ virale 2A Peptide verwendet (Hu et al. 2009). Bei letzteren handelt es sich um eine 18-22 As lange Sequenz, die über eine *self cleavage* Aktivität verfügt. Das Reporterkonstrukt wird in einem offenen Leserahmen (ORF) exprimiert und anschließend posttranslationell via *ribosome skipping* Mechanismus prozessiert (Shao et al. 2009, Donnelly et al. 2001b, Donnelly et al. 2001a). Es wird demnach als ein Polyprotein exprimiert und im Anschluss in individuelle Proteine geschnitten (Hu et al. 2009).

2.7.2 Erzeugung stabiler Reporterzelllinien

Für die Etablierung von promotor- und zellbasierten RGA werden grundsätzlich die transiente Transfektion oder die stabile Expression der Reporterkonstrukte genutzt (Kain und Ganguly 2001). Transiente Transfektionen sind bei einer großen Anzahl von Zelllinien verschiedener Spezies mit sehr guter Transfektionseffizienz durchführbar. Dennoch ist die Expression des Transgens zeitlich begrenzt, da die eingebrachte DNA in den Zellen schnell degradiert wird. Um eine gleichbleibende und beständige Expression der Reporterkonstrukte über einen langen Zeitraum gewährleisten zu können, ist die Generierung stabiler Zelllinien sinnvoll. Dabei wird

das Reporterkonstrukt dauerhaft in das Genom der Reporterzelllinien integriert und exprimiert.

Stabile Reporterzelllinien können auf unterschiedlichem Wege hergestellt werden. Eine gängige Methode ist die homologe Rekombination. Die Integration der DNA erfolgt über eine Rekombination homologer DNA-Sequenzen (Nandi et al. 1988, Smith 1988). Im Anschluss werden die gewünschten monoklonalen Zellklone durch Antibiotika selektiert. Dieser Prozess ist jedoch sehr ineffizient, aufwendig und zeitintensiv.

Der Gentransfer und die stabile Integration der Konstrukte können ebenfalls durch retro- und lentivirale Transduktion erreicht werden. Auch dabei müssen monoklonale Zellklone selektiert werden. Problematisch bei beiden Ansätzen ist jedoch, dass Ort und Häufigkeit der genomischen Integration zufällig sind (Hu et al. 2009, Wolkowicz et al. 2004, Lorens et al. 2001).

Zur Vermeidung einer randomisierten Integration des Konstrukts im Wirtsgenom wurden rekombinase-vermittelte Verfahren entwickelt. Die Flp-Rekombinase ist ein Enzym, das eine sequenzspezifische Integration der Zielsequenz an einer definierten Stelle im Genom (FRT-Stelle) katalysiert (Craig 1988, Sauer 1994). Mit Hilfe des Flp-In®-Systems (Invitrogen) ist eine schnelle und einfache Generierung von stabilen Zelllinien möglich. Durch die rekombinase-vermittelte Integration des Konstrukts in das Wirtsgenom entstehen isogene Zelllinien (keine monoklonalen Zelllinien). Da aber bei dem Flp-In®-System idealerweise nur Zellklone mit vollständig inserierter Targetsequenz selektiert werden, sollten diese Zellklone genetisch identisch sein. Routinemäßig kann die Integration der Konstrukte mit Hilfe von Southern Blot Analysen verifiziert werden (Handbuch Flp-In®-System (Invitrogen); http://www.lifetechnologies.com).

3 Ziel der Arbeit

Die Entdeckung der induzierten pluripotenten Stammzellen stellt einen Durchbruch für die Grundlagenwissenschaften dar. Mit ihnen werden die Generierung und die Verwendung von patienten-spezifischen Stammzellen für die regenerative Medizin erst denkbar. Daher sind die Erforschung der molekularen Ursachen der Reprogrammierung von differenzierten Zellen und die Erhöhung der Reprogrammierungseffizienz von besonderem wissenschaftlichen Interesse (Stadtfeld und Hochedlinger 2010).
Das Ziel der Arbeit war die Etablierung und Optimierung eines vielseitig einsetzbaren, hochdurchsatzfähigen Screeningsystems in der humanen embryonalen Nierenzelllinie Flp-In©293 zur Identifizierung kurzer Polypeptide mit expressionsmodulierender Wirkung auf das humane *OCT4* Gen (Abb. 8).

Zu diesem Zweck sollten im Rahmen der Versuche:

- ein tri-funktionelles Reporterkonstrukt unter Kontrolle des humanen *OCT4*-Promotors hergestellt,
- eine stabile humane Zelllinie generiert (Abb. 8 [2]),
- eine komplexe, randomisierte Peptidbibliothek erzeugt und mittels retroviraler Transduktion in die Reporterzelllinien eingebracht (Abb. 8 [1, 3]),
- mit Hilfe von unterschiedlichen Strategien nach aktivierenden Polypeptiden gesucht (Abb. 8 [4]),
- die Aminosäuresequenzen via *Rescue PCR* und Sequenzierung identifiziert (Abb. 8 [5]),
- und putative Targets in weiterführenden Experimenten verifiziert und validiert werden (Abb. 8 [6]).

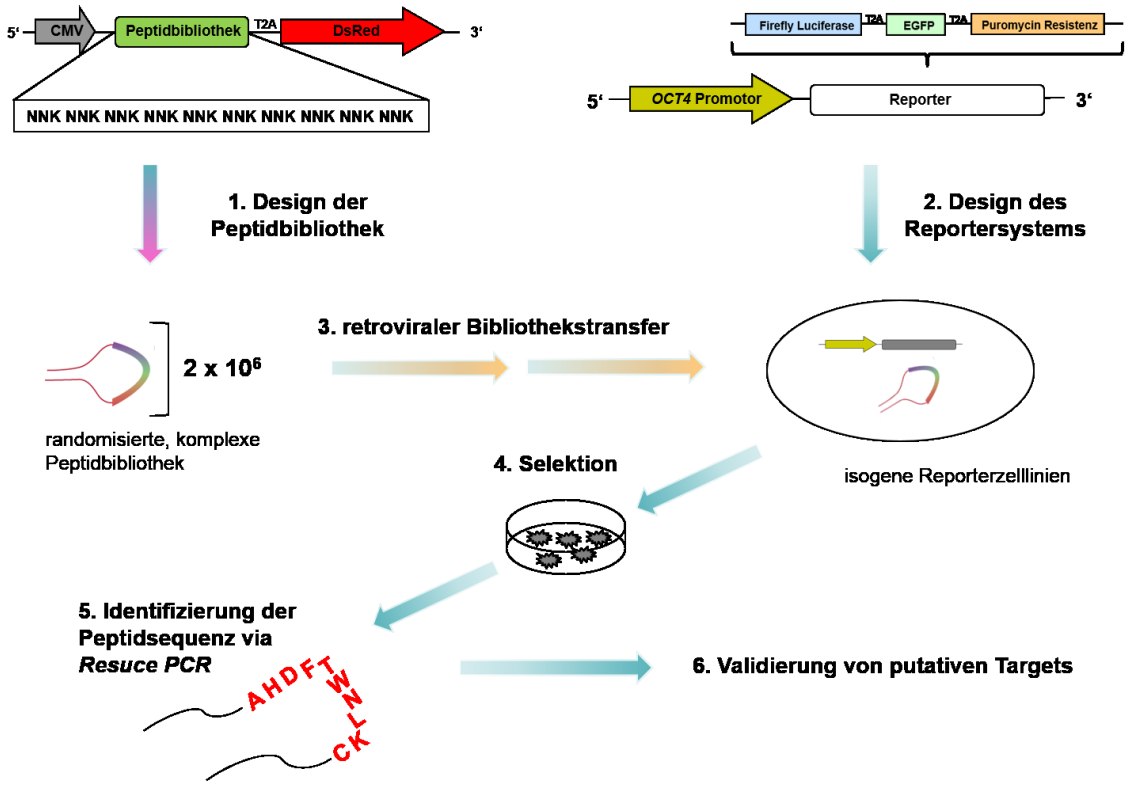

Abbildung 8: Versuchsdesign

Schematisch dargestellt werden das Design und der Versuchsablauf eines zellbasierten Screeningsystems zur Identifizierung kurzer Polypeptide mit aktivierender Wirkung auf die Expression stammzell-assoziierter Gene. Dieses Screeningsystem setzt sich aus dem Design, der Generierung und dem retroviralen Transfer einer randomisierten Peptidbibliothek [1, 3] und der Herstellung einer isogenen Reporterzelllinie, die ein tri-funktionales Reporterkonstrukt unter der Kontrolle des humanen *OCT4* Promotors exprimiert, zusammen [2]. Die identifizierten putativen Targets werden mit Hilfe unterschiedlicher Strategien selektiert [4], die Peptidsequenzen via *Rescue PCR* identifiziert [5] und erfolgversprechende Targets in weiterführenden Untersuchungen validiert [6]; modifizierte Abbildung nach (Xu et al. 2001, Roepe 2001).

4 Material und Methoden

4.1 Molekularbiologie

4.1.1 Molekularbiologische und biochemische Standardmethoden

Der Einsatz molekularbiologischer und biochemischer Standardmethoden erfolgte auf Basis von Protokollen aus *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Sambrook 2001). Die Versuche, in denen Kits zum Einsatz kamen, sind nach Herstellerangaben durchgeführt worden (Tab. 3).

Tabelle 3: Standardkits

Anwendung	**Kit**	**Hersteller**
Restriktionsverdau	verschiedene Restriktionsenzyme	New England Biolabs
DNA Aufreinigung (Agarose-Gelextraktion)	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmidaufreinigung	QIAprep Spin Mini Prep Kit	Qiagen
	Pure Link™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen
Plasmid DNA Ligation	T4 DNA Ligase	Promega
TA Klonierung	pGEM®-T Easy Vector System	Promega
RNA Extraktion	RNA Bee™ Kit	BIOZOL
PCR	Advantage®2 Polymerase Kit	Clontech Laboratories

4.1.2 Oligonukleotide und PCR Primer

Die verwendeten Oligonukleotide und PCR Primer wurden mit Hilfe der Programme Vektor NTI (Invitrogen, Version 10) und Primer3 (Koressaar und Remm 2007, Untergasser et al. 2012) entworfen und von der Firma MWG Eurofins geliefert (Tab. 4). Alle Zielsequenzen der Gene wurden mittels *NCBI Gene* Datenbank identifiziert (*National Center of Biotechnology Information*; http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabelle 4: Oligonukleotide und PCR Primer

Bezeichung	**Sequenz (5‘ – 3‘ Orientierung)**
Peptidbibliothek	
PB Oligo1	GCGGCCACTAAGTGAGCCGCCACCATGGGCNNKNNKNNKNNKNNK NNKNNKNNKNNKNNKGGGGGGCCGCCGCACGGCGT
PB Oligo2	ATGATGCACGCCGTGCGGCGGCCCCCC
PCR Primer	
EGFP-KpnI fw	ATCGTAGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT
EGFP-AvrII rv	ACGTACCCTAGGCTTGTACAGCTCGTCCATGC
Firefly-HindIII fw	ACGTACAAGCTTATGGAAGATGCCAAAAACAT
Firefly-AflII rv	TGCATCCTTAAGCACGGCGATCTTGCCGCCCTTCTT
Puro-NsiI fw	AGTGCTATGCATACCGAGTACAAGCCCACGGT
Puro-NotI rv	CTAGCTGCGGCCGCTCAGGCACCGGGCTTGCGGG
PB-Rescue fw	AGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA
PB-Rescue rv	TCACGCCGATGAACTTCACCTTG
Sequenzierungsprimer	
pcDNA5/FRT 1	CCGTCTTCGAGTGGGTAGAA
pcDNA5/FRT 2	TGACCGACAATTGCATGAAG
pcDNA5/FRT 3	AGCTACAACAAGGCAAGGCT
Southern Blot Sonde	
Luc SB fw	AGGGCCCAGCGCCATTCTACCCA
Luc SB rv	GCCGAAGCCGTGGTGAAATGG

4.1.3 Konstruktdesign

Die Generierung der Basiskonstrukte (*backbone*) für das tri-funktionelle Reporterkonstrukt und die Peptidbibliothek erfolgte *in silico*. Dafür wurden die Sequenzen mit Hilfe des Programmes Vektor NTI konzipiert (Abb. 9). Diese DNA-Konstrukte verfügten über eine Vielzahl unterschiedlicher Restriktionsschnittstellen sowie andere Funktionalitäten z.B. HisTag und T2A Sequenzen. Die Konstrukte wurden in einen offenen Leserahmen (ORF) exprimiert. Hierbei war eine hohe Genauigkeit der DNA-Sequenz von besonderer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden die *in silico* designten Sequenzen bei der Firma MWG Eurofins synthetisiert und im Anschluss in die Zielvektoren einkloniert.

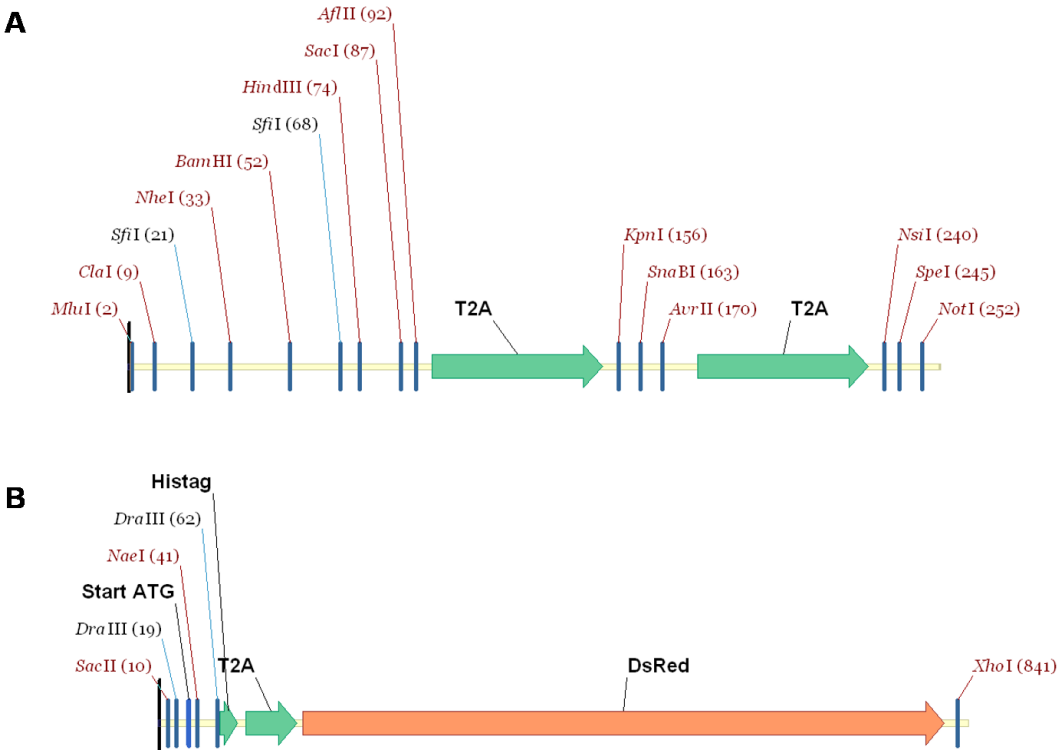

Abbildung 9: Aufbau der *backbone* Konstrukte

Gezeigt wird der schematische Aufbau der *backbone* Konstrukte für (A) das tri-funktionelle Reporterenzym und (B) die Peptidbibliothek mit Restriktionsschnittstellen und weiteren Funktionalitäten (HisTag, T2A Sequenzen, DsRed2 Gen).

4.1.4 Klonierung

Für die Klonierungsexperimente zur Sequenzierung und zur Amplifikation von Zielsequenzen wurden PCR Fragmente in den pGEMT-Easy Vektor (Promega) zwischenkloniert. Bei gerichteten und komplexen Klonierungsexperimenten wurden die Vektoren (*backbone* Konstrukte) und die Insertsequenzen (Plasmide oder PCR Produkte) mit jeweils spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut und nach Aufreinigung in die Zielvektoren ligiert (T4 DNA Ligase).
Um die Anzahl falsch-positiver Klone zu minimieren, wurde ein Präselektionsverdau durchgeführt. Dabei schneidet das Restriktionsenzym Donor- sowie Rezipientenplasmid nicht aber das finalen Konstrukt. Auf diesem Wege können alle unerwünschten Zwischenprodukte der Klonierung entfernt werden. Das ligierte Plasmid wurde anschließend in TOP10 (Invitrogen) chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien (*E.coli*) eingebracht. Die Durchführung der Transformation erfolgte nach Herstellerangaben.
Danach wurden die transformierten *E.coli* auf LB/Amp-Agarplatten (Ampicillinkonzentration 100 µg/ml) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht (ü/N) inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden einzelne Kolonien (Klone) gepickt und in Flüssigkulturen (Minikultur: 3 ml LB/Amp-Medium; Ampicillinkonzentration 100 µg/ml) bei 37 °C ü/N im Schüttler amplifiziert.

4.1.5 Southern Blot

Der Southern Blot (SB) ist ein Analyseverfahren zum Nachweis von DNA-Sequenzen. Das Verfahren basiert auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, Doppelstränge auszubilden (DNA Hybridisierung durch komplementäre Basenpaarung). Deshalb kann aus einem komplexen DNA-Gemisch eine spezifische Zielsequenz detektieren werden (Southern 1975).
In der Arbeit erfolgte die Kontrolle der genomischen Integration der Konstrukte in den Reporterzellen durch den Einsatz eines „nicht-radioaktiven“ Southern Blots (Roche). Der Southern Blot wurde nach Angaben und Anleitung des Herstellers durchgeführt (Tab. 5).

Tabelle 5: Durchführung Southern Blot

Ablauf	Tätigkeit
Tag 1	Restriktionsverdau der genomischen DNA (ü/N) Southern Blot Sondensynthese
Tag 2	Agarose-Gelelektrophorese DNA Transfer (Blot) DNA-Fixierung auf Membran Hybridisierung (ü/N)
Tag 3	Detektion Entwicklung

4.1.5.1 Southern Blot Sonde

Für die Synthese der Southern Blot Sonde kam das *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche) zum Einsatz. Die Sonde sollte eine Sequenz im Luciferasegen erkennen und somit spezifisch die Integration des Konstrukts ins Genom der Reporterzellen anzeigen. Zur Sondensynthese wurden PCR Primer (Tab. 4; Luc SB fw/rv) designt. Die Durchführung der Versuche erfolgte nach Herstellerangaben. Die optimale Hybridisierungstemperatur wurde entsprechnend berechnet und experimentell angepasst (Abb. 10).

4.1.5.2 Restriktionsverdau und Bloting

Im ersten Schritt der Southern Blot Analysen wurde die genomische DNA aus den Reporterzellen extrahiert (Sambrook 2001). Im Anschluss wurde die DNA mit für die jeweilige Zelllinie spezifischen Restriktionsenzymen über Nacht verdaut und via Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die nach der Größe aufgetrennten DNA-Fragmente wurden dann auf eine Nylonmembran (Blot) mittels Vakuumblot übertragen (geblottet). Nach dem Transfer wurde die DNA durch UV-Crosslinking immobilisiert.

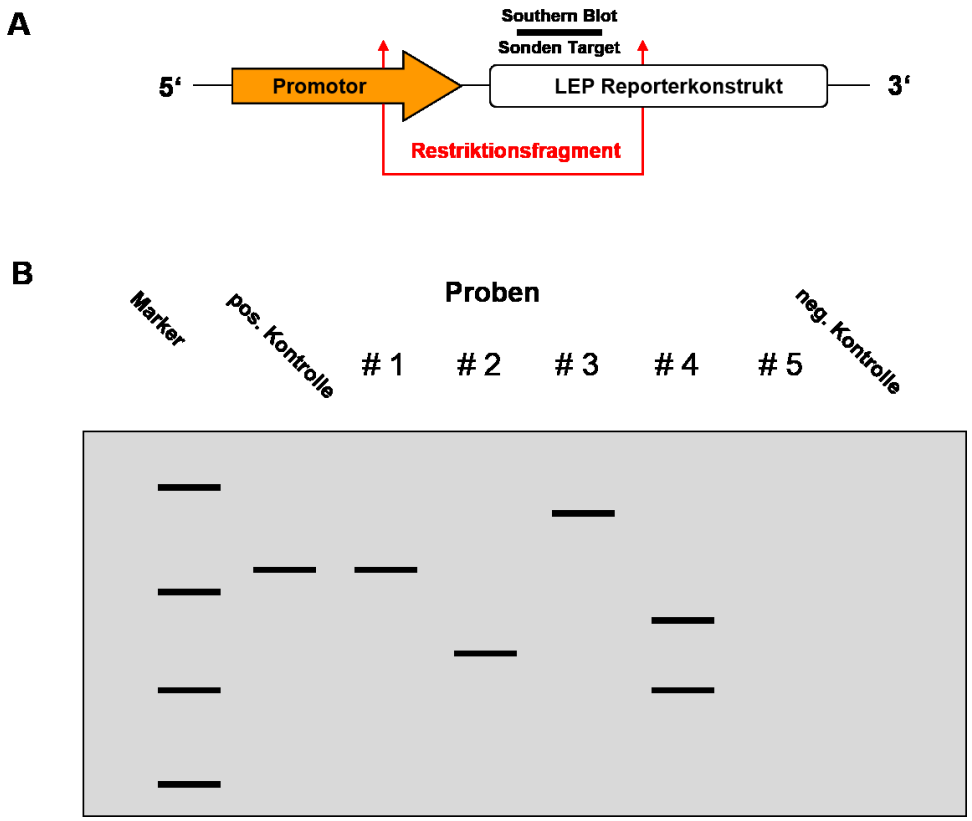

Abbildung 10: Southern Blot Analysen

(A) Schematisch dargestellt ist der Aufbau des Konstrukts mit der Bindungsstelle der Southern Blot Sonde und dem Restriktionsverdaufragment. (B) zeigt schematisch die möglichen Ergebnisse der Southern Blot Analysen: # 1 vollständige Integration des Konstrukts (Bande bei definierter Größe), # 2, # 3, # 4 Integration verkürzter Varianten des Konstrukts und # 5 keine Integration des Konstrukts. Darüber hinaus sind ein DIG markierter Größenstandard, eine Positiv-Kontrolle (Bande bei definierter Fragmentgröße) und eine Negativ-Kontrolle (keine Bande) abgebildet.

4.1.5.3 Hybridisierung und Detektion

Der Blot wurde dann im Hybridisierungspuffer prä-hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte im Anschluss (denaturierte SB Sonde im Hybridisierungspuffer) über Nacht im Hybridisierungsofen (Rollinkubator) bei 50 °C. Nach der Hybridisierung wurde die ungebundene Sonde durch Waschen entfernt. Für die Detektion wurde das *DIG Luminescent Detection Kit* (Roche) verwendet. Bei der Sondensynthese wurden Digoxigenin (DIG) markierte Nukleotidtriphosphate (DIG-dUTP) in die SB Sonde eingebaut. Diese können durch einen spezifischen Antikörper (*Anti-Digoxogenin-AP, Fab fragments*, Roche) erkannt und gebunden werden. Der Anti-Digoxigenin-Antikörper ist mit der alkalischen Phosphatase (AP) markiert.

Die AP ist in der Lage, ein Substrat (CPD™-Star, Roche) unter Lichtfreisetzung umzusetzen. Dieser Prozess wird Chemolumineszenz genannt und kann auf einem Röntgenfilm dargestellt werden.

4.1.6 Randomisierte Peptidbibliothek

Das Basiskonstrukt für die Peptidbibliothek wurde wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben *in silico* designt und die Sequenz bei der Firma MWG Eurofins synthetisiert. Anschließend wurde das Basiskonstrukt (Abb. 9 [B]) in den bi-cistronischen retroviralen Expressionsvektor pQCXIX (Clontech) kloniert. Die gerichtete Einklonierung der Bibliotheksequenz in den *backbone Vektor* (pQCXIX Basis) erfolgte mit dem Restriktionsenzym DraIII. Im Erkennungsmotiv des Enzyms befinden sich variable Basen. Auf diesem Weg können zwei unterschiedliche DNA-Sequenzen mit einem Enzym verdaut werden. Die randomisierte Sequenz besteht aus 10 Codons mit einem NNK Motiv (N codiert für A, G, T, C; K codiert für G, T). Das verwendete NNK Motiv soll die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Stoppcodons reduzieren. Für die Bibliotheksynthese wurden zwei teilweise hybridisierende Oligonukleotide entworfen (Tab. 4; PB Oligo1/2). Diese wurden in einer Auffüllreaktion äquimolar eingesetzt und elongiert (Tab. 6). Für die Auffüllreaktion wurde das Advantage® 2 Polymerase Kit (Clontech) verwendet (Ansatz (50 µl): 5 µl 10x Advantage PCR Buffer, 5 µl Oligo 1/2 (50 pmol), 2 µl dNTP (je 10 mM), 1 µl Advantage 2 Polymerase, 32 µl ddH_2O).

Tabelle 6: Programm der Auffüllreaktion

Temperatur	Zeit
95°C	5 min
68°C	60 min
4°C	Pause

Die Produkte der Auffüllreaktion wurden über ein 2 %iges Agarose-Gel aufgereinigt, mit DraIII verdaut, in den pQCXIX Basis Vektor (ebenfalls mit DraIII verdaut) ligiert (T4 DNA Ligase, Clontech) und nach Transformation in *E.coli* auf 135 cm^2 LB/Am-Agarplatten (Ampicillinkonzentration 100 µg/ml) für 48 h inkubiert (Ligationsansatz (20 µl): 200 ng Vektor, 20 ng PB Insert, 2 µl 10x Ligation Buffer, 1 µl T4 Ligase, x µl ddH_2O).

4.1.7 Identifizierung der Peptidsequenzen (*Rescue PCR*)

Die Identifizierung der Peptidsequenzen erfolgte unter Verwendung einer *Touchdown PCR* (Tab. 7). Zu diesem Zweck wurden PCR Primer designt (Tab. 4; Primer PB-*Rescue* fw/rv), welche die Bibliotheksequenz flankieren (Abb. 24 [A]). Als Template für die PCR wurde entweder extrahierte genomische DNA oder ein Zellpellet der Reporterzellen verwendet. Die PCR Produkte wurden aufgereinigt und in den pGEM®T Easy Vektor zwischenkloniert. Zur Validierung der Ergebnisse wurde die PB-Sequenz mit DraIII verdaut und in den retroviralen Expressionsvektor (pQCXIX Basis) kloniert. Anschließend wurden diese Vektoren in die Reporterzellen transfiziert und auf eine Aktivierung des Reporters untersucht.

Tabelle 7: *Touchdown Rescue PCR* Programm

Arbeitsschritt	Dauer [s]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	600	95	
Denaturierung	30	95	
Annealing	30	68	5
		66	5
		63	30
Elongation	60	68	
Finale Elongation	300	68	

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Zelllinien und Standardkulturbedingungen

In der Arbeit wurde mit der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293 und daraus abgeleiteten Zelllinien gearbeitet (Tab 8.). Die routinemäßige Kultivierung der Zellen erfolgte auf 60 cm^2 Zellkulturschalen (TTP) bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank (Binder). Zur Stammerhaltung wurden die Zellen bis zu 70-90 %iger Konfluenz kultiviert und dann gesplittet. Alle durchgeführten Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Werkbank ausgeführt. Als Standardmedium wurde das *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM, high Glukose (4,5 g/l); PAA) verwendet, das 10 % fötales Kälberserum (FCS, Biochrom AG), 50 units/ml Penicillin (PAA), 50 µg/ml Streptomycin (PAA), 1 mM L-Glutamin (PAA) und 10 mM HEPES Puffer (PAA) enthielt.

Tabelle 8: Übersicht verwendeter Zelllinien

Zelllinie (Bezugsquelle)	**verwendetes Medium, Selektionsantibiotikum**
HEK 293	HEK-Standardmedium
Flp-In™-293 (Invitrogen)	HEK-Standardmedium
GP2-293 (Clontech Laboratories)	HEK-Standardmedium
im Verlauf der Arbeit generierte stabile Flp-In™-Zelllinen	HEK-Standardmedium, 100 µg/ml Selektionsmedium Hygromycin B

4.2.2 Transiente Transfektion

Die Durchführung von routinemäßigen Transfektionen erfolgte unter Verwendung des Roti®-Fect Transfektionssystems (Roth) nach Herstellerangaben. Nur in Ausnahmefällen wurden Parameter wie Zellzahl, Masse der DNA und Volumen des Transfektionsmediums angepasst und optimiert. Die Analyse der transfizierten Zellen wurde nach 24-48 h Inkubation bei 37 °C im Luminometer durchgeführt.

4.2.3 Generierung stabiler isogener Zelllinien

Die Generierung der stabilen isogenen Zelllinien (Reporterzellen) erfolgte unter Verwendung des Flp-In^{TM}-Systems (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Bei diesem Expressionssystem handelt es sich um eine Flp-Rekombinase vermittelte Integration des Zielgens in das Wirtsgenom.
Für die Herstellung der stabilen Reporterzelllinien wurden Flp-In 293® Zellen mit dem Vektor für das jeweilige Reporterkonstrukt z.B. pcDNA5/FRT *OCT4*pr LEP und dem pOG44 Plasmid (Flp-Rekombinase) kotransfiziert. Nach der Tansfektion wurden die Zellen mit 300 µg/ml Hygromycin B im Standardmedium (Invitrogen) selektiert, expandiert und für die Langzeitlagerung in Kryostocks konserviert. Anschließend wurden die Zellen auf Funktionalität der einzelnen Reporterenzyme untersucht und die genomische Integration der Konstrukte mittels Southern Blot Analysen verifiziert.

4.2.4 Retroviraler Gentransfer der Peptidbibliothek

Die stabile Expression der Peptidbibliothek in den Reporterzellen war für den Erfolg der Screening Versuche wichtig. Aus diesem Grund erfolgte der PB-Transfer mittels retroviraler Transduktion, wobei das retrovirale Gentransfer- und Expressionssystem (Clontech Laboratories) zum Einsatz kam. Diese Versuche wurden in zwei Schritten durchgeführt.
Der erste Schritt bestand in der Synthese der Viruspartikel, die in der Verpackungszelllinie GP2-293 (Clontech Laboratories) erfolgte. Für die Transfektion der Verpackungszellen kam das *CalPhos Mammilian Transfection* Kit (Clontech Laboratories) zum Einsatz. Da die Transfektionseffizienz für die Virussynthese besonders hoch (≥95 %) sein sollte, wurden die einzelnen Parameter für die Transfektion experimentell etabliert und optimiert (Abschnitt 5.6).
Der zweite Schritt des PB-Transfers war die retrovirale Transduktion der Reporterzellen. Die Infektion der Reporterzellen erfolgte exakt nach der Anleitung des Herstellers. Die Virussynthese und die retrovirale Transduktion sind Versuche, die nach den Richtlinien der Sicherheitsstufe 2 (S2) durchgeführt wurden (Abb. 11).

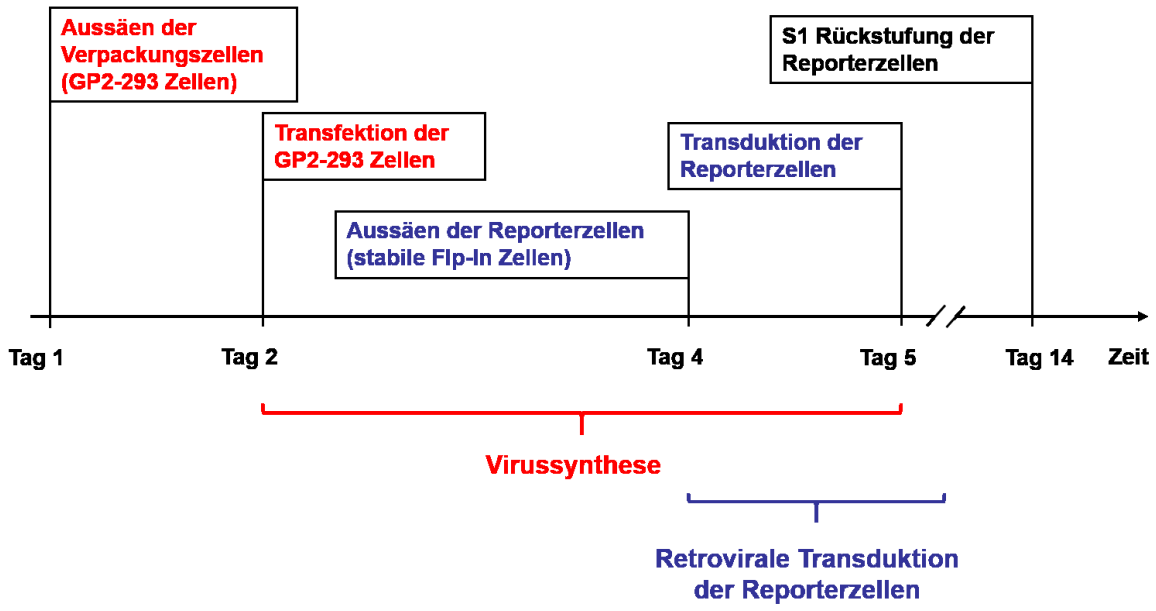

Abbildung 11: Ablauf des retroviralen PB-Transfers

Gezeigt wird der zeitliche Ablauf des retroviralen Gentransfers der Peptidbibliothek in die Reporterzellen. Die Virussynthese (Aussaat und Transfektion der Verpackungszellen GP2-293) und die Transduktion (Aussaat und Infektion der Reporterzellen) wurden gemäß der Bestimmungen der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

4.3 *In vitro* Analyse Methoden

4.3.1 Transiente Luciferase-Assays

Die Funktionstests der Reporterkonstrukte (Luciferase) basieren auf dem *Luciferase Assay System* (Promega). Sie wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 60 cm^2 Schalen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % in HEK Standardmedium kultiviert und am Vortag der Transfektion in 96 Well „Luminometerplatten“ überführt (µClear Platten 96K; Greiner BIO-ONE). Bei der Transfektion wurden 100-150 ng des zu testenden Plasmides eingesetzt (Abschnitt 4.2.2). Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte 24-48 h nach der Transfektion (hnT) im Luminometer (Labsystems Luminoskan RS), wobei ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll und die Luminoscan RII Software zum Einsatz kamen (Mrowka et al. 2007). Die Ergebnisse der Luciferaseaktivitätsmessungen wurden entweder auf die Gesamtproteinmenge oder die in den Versuchen eingesetzte Zellanzahl normiert.

4.3.2 *In vivo* Messungen der Luciferaseaktivität

Die Messung der Luciferaseaktivität *in vivo* kam vor allem bei der Validierung der Screeningergebnisse zum Einsatz. Da die Zellen bei diesen Messungen nicht lysiert wurden, waren mehrfache Messungen möglich (Maier et al. 2009). Mit Hilfe dieser Methode konnten entweder die Basisluciferaseaktivität der Reporterzellen oder die Einflüsse kurzer Polypeptide auf die Expression des Reportergens untersucht werden. Bei den Versuchen wurden die Zellen in 60 cm^2 Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % in HEK Standardmedium kultiviert. Diese Zellen wurden dann in „Luminometermedium“ (HEK Standardmedium ohne Phenolrot, 250 µg/ml Luziferin D (pjk)) aufgenommen und in 96 Well „Luminometerplatten“ (Greiner BIO-ONE) überführt (Maier et al. 2009). Die Messung der Luciferaseaktivität wurde im Luminometer (Labsystems Luminoskan RS) unter Verwendung der Luminoscan RII Software durchführt (Messzeit 60 s pro Well).

4.3.3 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse)

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit der *Flow Cytometry Core Facility* (FCCF) am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in Berlin durchgeführt. Diese Versuche (FACS Analysen mit und ohne Zellsortierung) erfolgten unter der technischen Anleitung von Dipl.-Ing. (FH) Toralf Kaiser und Dipl.-Biochem. Jenny Kirsch. Die Probenaufarbeitung und bioinformatische Auswertung der Daten erfolgten ebenfalls nach Anleitung der FCCF. Bei der Auswertung der Daten kam die Analyse-Software Cyflogic™ (CyFlo) zum Einsatz.

4.4 Statistik

Alle in der Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden in mindestens zwei unabhängigen Versuchen erhoben. Die statistische Auswertung der Daten für die Luciferasemessungen erfolgte auf Basis von mindestens zwei Versuchsserien mit jeweils mehreren Einzelproben (4 bis 8), wobei die Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt wurden. Die statische Signifikanz wurde entweder

mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests oder dem *one-way ANOVA Test* (einfache Varianzanalyse) mit anschließendem *Dunnett Post-hoc Test* (multipler Vergleichstest) berechnet. Die berechneten p-Werte wurden in den Diagrammen wie folgt angegeben: ***** $p < 0,05$; ****** $p < 0,01$; ******* $p < 0,001$.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Programme Excel (Microsoft) oder GraphPad (GraphPad Software).

4.5 Optische Darstellung der Zellen (Mikroskopie)

Die optische Darstellung der Zellen erfolgte mittels eines inversen Mikroskops (Axiovert S100, Carl Zeiss). Die Aufnahmen wurden für die zu untersuchenden Zellen und die jeweiligen Kontrollzellen in 60 cm^2 Zellkulturschalen (TPP) mit der gleichen Vergrößerung aufgenommen (meist 40fache Vergrößerung).

Für Fluoreszenzaufnahmen wurden die Zellen dann zusätzlich bei der gleichen Vergrößerung mit dem jeweiligen Fluoreszenzfilter aufgenommen und abgebildet (Extinktions-/ Emissionsmaximum: DsRed2 557 nm / 579 nm (Zeiss Filtersatz 43HE); EGFP 488 nm / 507 nm (Zeiss Filtersatz 10). Die Bilder wurden unter Verwendung von MetaMorph Offline aufgenommen und im Anschluss mit Photoshop® CS3 (Adobe) oder ImageJ bearbeitet.

5 Ergebnisse

5.1 Design und Herstellung der LEP-Reporterkonstrukte

Die Anwendung stabiler humaner Zelllinien mit multiplen, exogenen Reportergenaktivitäten stellt ein wichtiges Verfahren bei der Etablierung promotorabhängiger Screeningsysteme dar. Dabei sind Reporterkonstrukte, die mehrere Selektions- und Screeningstrategien erlauben, besonders vorteilhaft.

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Schritt ein tri-funktionelles Reporterkonstrukt (LEP-Reporter) erstellt, welches im zweiten Schritt auf Funktionalität getestet wurde. Als drei unterschiedliche Reportergenaktivitäten wurden die Firefly Luciferase, das EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und die Puromycin-N-Acetyl-Transferase (Puromycinresistenz) ausgewählt. Die gleichzeitige Verwendung von viralen 2A-Peptiden garantierte zudem ein unimolares Expressionsverhältnis der einzelnen Reporterenzyme. Damit das komplette Konstrukt später in den Zellen funktionstüchtig ist, musste es in einem Leserahmen (ORF - open reading frame) exprimiert werden.
Zu Beginn der Erstellung des Reporterkonstrukts wurde eine DNA-Sequenz (*backbone*) *in silico* konzipiert, welche über eine *multiple cloning site* (MSC), Restriktionsschnittstellen zur Einklonierung der Reporterenzyme und Promotoren sowie über zwei T2A Peptidsequenzen verfügte (Abb. 12 [A]). Diese *backbone* Sequenz wurde anschließend durch die Firma MWG Eurofins synthetisiert.
Im nächsten Schritt wurden die Sequenzen der drei Reporterenzyme in die *backbone* Sequenz einkloniert. Die entsprechenden Sequenzen wurden dabei mit Hilfe von im Labor vorhandenen Plasmiden amplifiziert, wobei PCR Primer mit spezifischen Überhängen (Schnittstellen für Restriktionsenzyme) zum Einsatz kamen (Tab. 4).

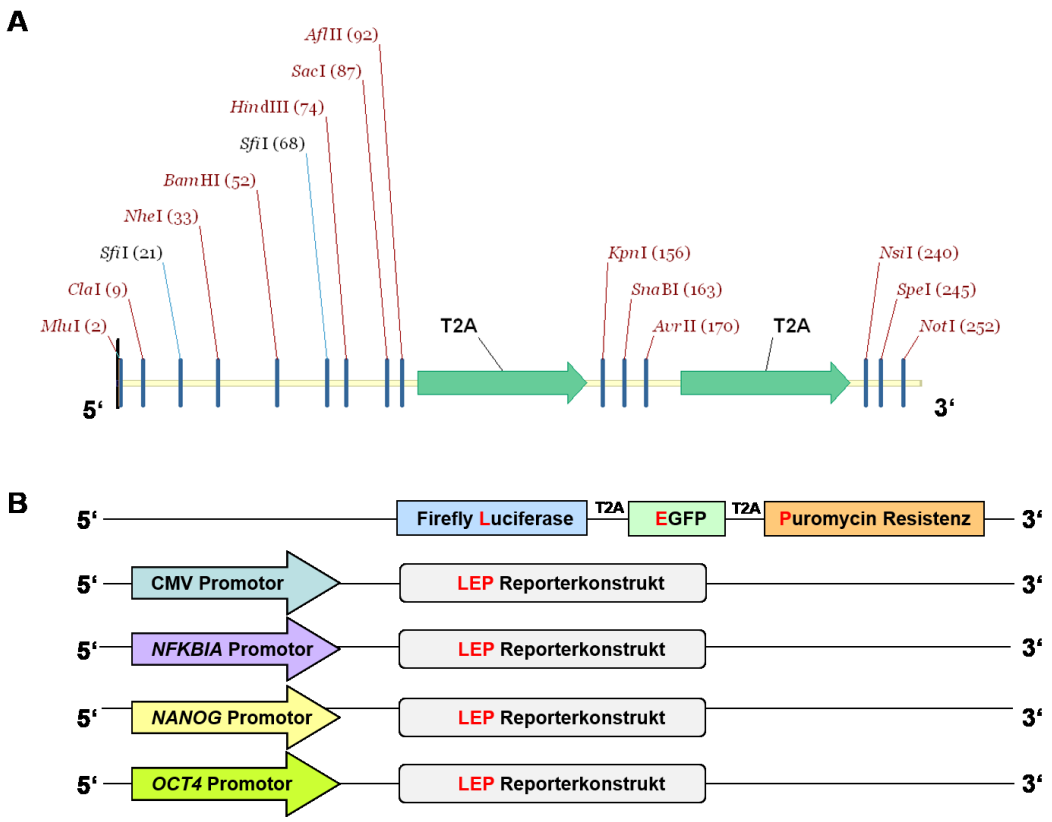

Abbildung 12: *Backbone*- und Reporterkonstrukte

(A) zeigt das Design des *Backbone* Konstrukts mit spezifischen Restriktionsschnittstellen und zwei *self cleavage* T2A-Peptiden. (B) zeigt die verwendeten Reporterkonstrukte und ihren schematischen Aufbau.

Abschließend wurden die jeweiligen Promotoren in das Konstrukt einkloniert. Es wurden Konstrukte mit den 5' regulatorischen Regionen der humanen *OCT4*, *NANOG* und *NFKBIA* Gene sowie mit dem Zytomegalievirus-Promotor (CMV Promotor aus dem pcDNA5/FRT Vektor (Invitrogen)) generiert (Tab. 9). Die Promotorsequenzen wurden aus im Labor vorhandenen Vektoren mit spezifischen Restriktionsschnittstellen gewonnen (Abb. 12 [B]) (Tab. 9). Die Bezeichnung der Gene erfolgte nach den Richtlinien für die Nomenklatur humaner Gene (Wain et al. 2002).

Tabelle 9: Genomische Lokalisation der humanen Promotorsequenzen

Promotor	genomische Lokalisation (human Feb. 2009 GRCh37/hg19)	Länge (Bp)
OCT4	chr6:31,138,479-31,141,149	2671
NANOG	chr12:7,939,245-7,942,210	2966
NFKBIA	chr14:35,873,996-35,874,296	301

Die genomische Lokalisation der humanen Promotorsequenzen erfolgte unter Verwendung von BLAT-Analysen (*BLAST-like alignment tool*; http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start) mit Hilfe des USCS Genom Browsers (*University of California, Santa Cruz*) (Tab. 9).

5.2 Funktionelle Erprobung der LEP-Reporterkonstrukte

Nach der Fertigstellung der Reporterkonstrukte wurden die einzelnen Enzymaktivitäten in transienten Transfektionsexperimenten in Flp-In® 293 Zellen auf ihre Funktionalität überprüft. Die Aktivität der Firefly Luciferase wurde mit Hilfe von Luciferase-Assays im Luminometer gezeigt. Die Expression des EGFP wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Mit Western Blot Analysen konnten die Aktivität und die Funktionalität des T2A Peptides sowie die hohe Prozessierungseffizienz des Konstrukts beobachtet werden. In transienten Transfektionsexperimenten ist die Expression der Transgene zeitlich begrenzt. Da die Selektion durch ein Antibiotikum langwierig ist, konnte die Funktionalität der „Puromycinresistenz“ auf diesem Wege nicht untersucht werden (Daten nicht gezeigt).

5.3 Herstellung und Funktionstest der Reporterzelllinien

Die Herstellung der stabilen Zelllinien erfolgte unter Verwendung des Flp-In Systems® (Invitrogen) (Abschnitt 4.2.3). Im Verlauf der Arbeit wurden für die humanen *OCT4*, *NANOG* und *NFKBIA* Promotoren sowie für den CMV Promotor

stabile Reporterzelllinien generiert (Abb. 12 [B]). Die beiden letzten Zelllinien dienten insbesondere zur Etablierung und Optimierung des Screeningsystems.

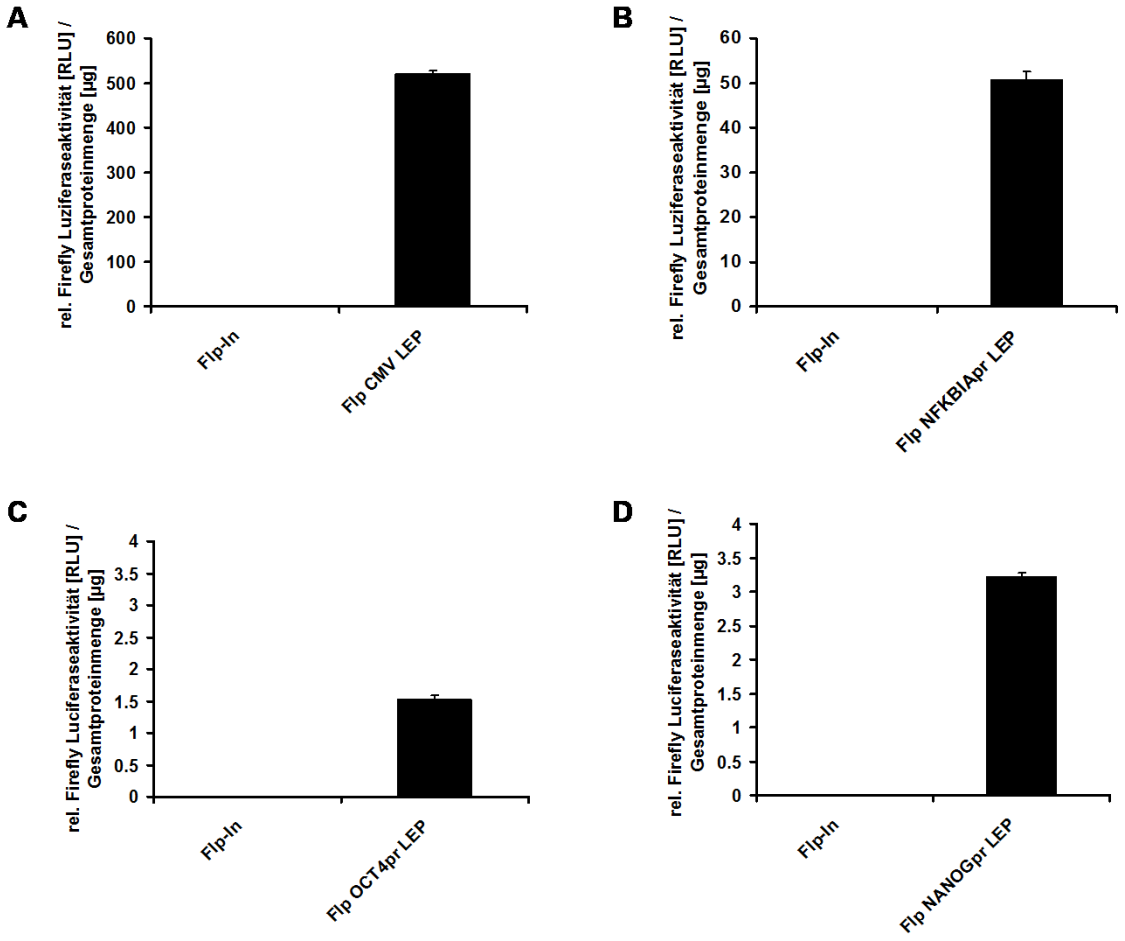

Abbildung 13: Funktionstest der Reporterkonstrukte I

(A-D) zeigen in Luciferase-Assays die funktionelle Basisexpression der Firefly Luciferase für die (A) Flp CMV LEP, (B) Flp *NFKBIA*pr LEP, (C) Flp *OCT4*pr LEP und (D) *NANOG*pr LEP Zelllinien jeweils im Vergleich zu Flp-In Kontrollzellen (normiert auf relative Luciferaseaktivität pro µg Gesamtprotein (n=8)).

Bei allen generierten Zelllinien konnte eine Basisaktivität des Reporterkonstrukts anhand der Firefly Luciferase detektiert werden (Abb. 13 [A-D]).

Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der EGFP Expression war aufgrund der geringen Basisaktivität der anderen Zelllinien nur für die Flp CMV LEP Zelllinie möglich (Abb. 14). Daher wurde die EGFP Expression für die Flp *OCT4*pr LEP Zelllinie mittels FACS-Analyse nachgewiesen (Abb. 15).

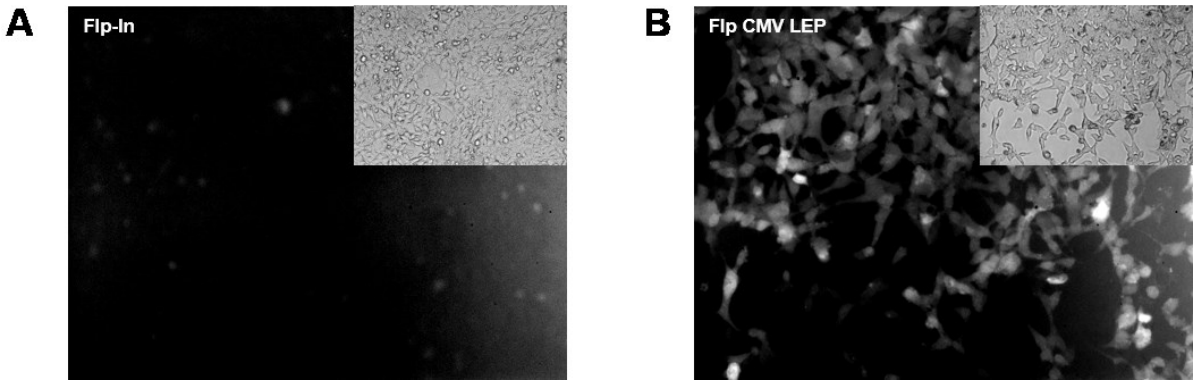

Abbildung 14: Funktionstest der Reporterkonstrukte II

(A, B) zeigen auf fluoreszenz- und durchlichtmikroskopischen Aufnahmen (Vergrößerung 200fach) die EGFP Basisexpression in (B) Flp CMV LEP im Vergleich zu (A) Flp-In Kontrollzellen.

Die funktionelle Expression der „Puromycinresistenz“ und die letalen Konzentrationen wurden für die einzelnen Reporterzelllinien durch Selektion der Zellen mit ansteigender Menge des Puromycins im Konzentrationsbereich zwischen 1-100 µg/ml bestimmt. Bereits die geringste Menge an Puromycin war für die Flp-In Zellen letal. Im Vergleich dazu lagen die ermittelten letalen Puromycinkonzentrationen bei den unterschiedlichen Reporterzelllinien zwischen 12,5-100 µg Puromycin pro ml Selektionsmedium. Die Expression des Reporterkonstrukts war in den generierten Zelllinien über einen langen Zeitraum zu beobachten. So zeigten z.B. die Flp *OCT4*pr LEP Zelllinie nach sechs Monaten Kultivierung (Passage 33) noch immer eine Expression des Reporters.

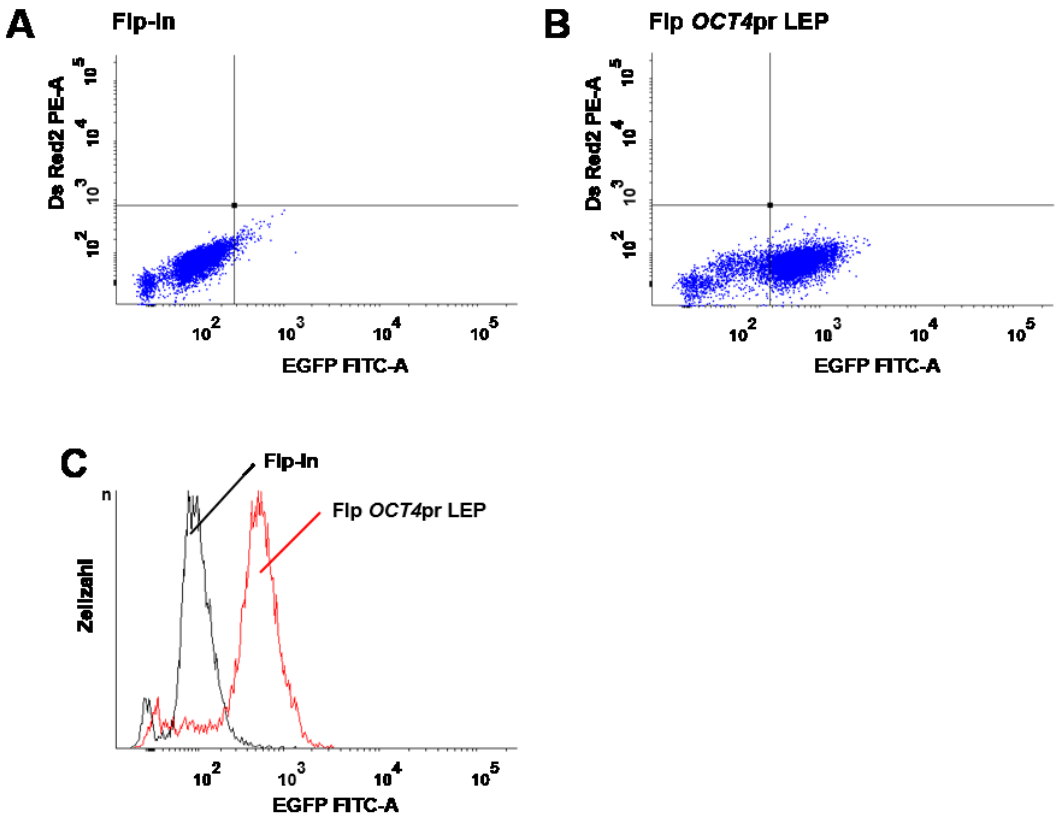

Abbildung 15: Funktionstest der Reporterkonstrukte III

Die FACS-Analysen zeigen eine distinkte EGFP Basisexpression für Flp *OCT4*pr LEP Zelllinien (B) in Vergleich zu Flp-In Kontrollzellen (A). Die Ergebnisse sind sowohl als Dot Plot (A, B) als auch in einem *Histogram overlay* (C) dargestellt (n=4).

5.4 Nachweis der genomischen Insertion der Reporterkonstrukte

Die Kontrolle der genomische Integration der Konstrukte in den Reporterzellen erfolgte durch nicht-radioaktiven Southern Blot (Roche). Für die Analysen wurde eine Southern Blot Sonde erstellt. Diese Sonde detektiert eine Sequenz im Luciferasegen und zeigt somit spezifisch eine Intergration des Konstrukts in den Zellen an (Abschnitt 4.1.5). Bei den durchgeführten Versuchen waren für die jeweiligen Zelllinien und verwendeten Restriktionsenzyme Banden zu beobachten, die den erwarteten Restriktionsfragmentgrößen entsprachen (Abb. 16). Die Southern Blot-Analysen ergaben für alle untersuchten Zelllinien eine genomische Integration des Konstrukts (Flp *OCT4*pr LEP, Flp *NANOG*pr LEP, Flp CMV LEP und Flp *NFKBIA*pr LEP).

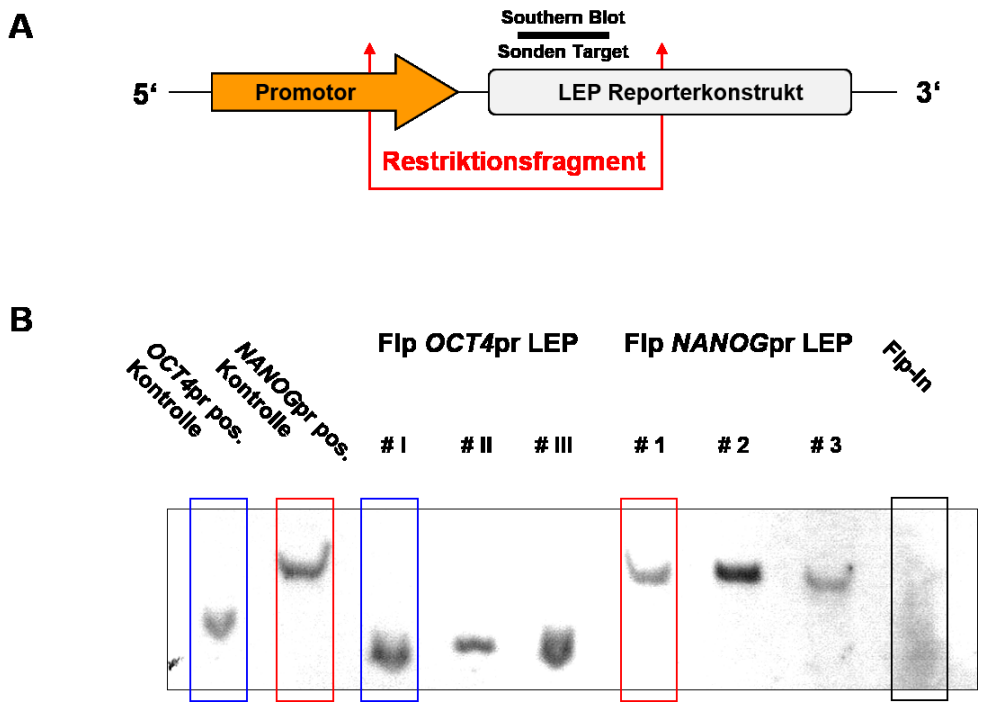

Abbildung 16: Integrationsnachweis der Konstrukte durch Southern Blot Analysen

(A) zeigt den schematischen Aufbau der Konstrukte mit der Bindungsstelle der Southern Blot Sonde und dem Restriktionsverdaufragment. (B) zeigt die genomische Integration der Konstrukte in jeweils drei Proben der Flp *OCT4*pr LEP (# I-III) und Flp *NANOG*pr LEP (# 1-3) sowie in Positiv-Kontroll-Zelllinien mit Hilfe von nicht-radioaktiven Southern Blot Analysen (n=2).

5.5 Design einer kombinatorischen biologischen Bibliothek

Im ersten Schritt der Synthese der kombinatorischen Peptidbibliothek wurde die DNA-Sequenz des *backbone* Konstrukts *in silico* erstellt und anschließend durch die Firma MWG Eurofins synthetisiert. Da analog zum Design des Reporterkonstrukts ein T2A Peptid zum Einsatz kam, musste das gesamte Konstrukt in einem ORF exprimiert werden. So sollte das Konstrukt über verschiedene Funktionalitäten verfügen (Abb. 17 [A]):

- spezifische Restriktionsschnittstellen (DraIII) zur gerichteten Einklonierung der Bibliotheksequenz,
- ein Histag zur Identifikation möglicher Interaktionspartner (Chen et al. 1993)
- ein T2A Peptid,
- sowie das DsRed2 Gen (rot fluoreszierendes Protein - DsRed) zur Kontrolle der Transfektion bzw. der Transduktion.

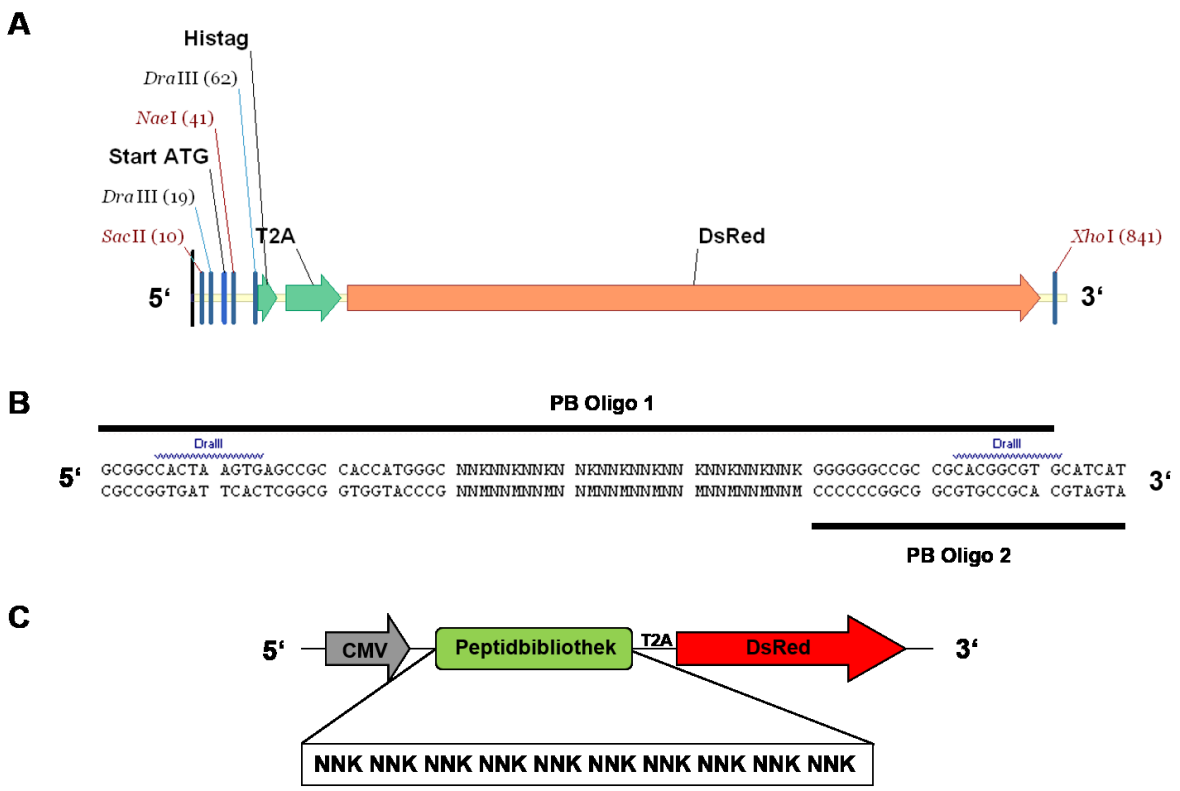

Abbildung 17: Peptidbibliothekskonstrukt

Schematisch gezeigt werden (A) der Aufbau des synthetisierten *backbone* Konstrukts, (B) die in der Auffüllreaktion eingesetzten teilweise komplementären Oligonukleotide (PB Oligo1/2) und (C) der Aufbau Peptidbibliothek.

Die Synthese der kombinatorischen Bibliothek erfolgte auf biologischem Wege. Dazu wurde eine 30 Basenpaare (Bp) lange Oligonukleotidsequenz designt, die 10 randomisierte Aminosäuren codiert. Diese Sequenz besteht aus einer sich wiederholenden Abfolge des NNK Codon-Motivs (Abschnitt 4.1.6).

Zur Synthese der Bibliothek wurden zwei teilweise komplementäre Oligonukleotide (Tab. 4; PB Oligo1/2) entworfen und bei der Firma MWG Eurofins synthetisiert.

Diese beiden Oligonukleotide wurden in einer Auffüllreaktion eingesetzt. Das generierte doppelsträngige DNA-Konstrukt wurde dann aufgereinigt, mit dem Restriktionsenzym DraIII verdaut und gerichtet in den pQCXIX Basis Vektor kloniert (Abb. 17 [B, C]). Im Anschluss daran wurde die PB in *E.coli* Zellen transformiert und diese auf LB Agarplatten exprimiert.

Im Vorfeld der PB-Synthese wurden die einzelnen Teilschritte etabliert und optimiert. Der Fokus lag dabei auf der Optimierung der Verdaueffizienz des Basiskonstrukts

(Plasmidmenge und Verdauzeit), des Ligations- und Transformationsprotokolls und der Inkubationszeit der ausplattierten *E.coli* Bakterien (Daten nicht gezeigt).
Auf den LB Agarplatten befanden sich bis zu 110 Kolonien pro cm^2. Im Vergleich dazu waren auf den Religationskontrollplatten nur 2 Kolonien pro cm^2 zu beobachten. Das entspricht einem Anteil des religierten oder nicht verdauten Basisvektors von < 2 %. Aufgrund dieser Ergebnisse ergab sich für die Synthese der komplexen, randomisierten PB bei 120 LB Agarplatten (135 cm^2 Petrischalen) eine rechnerische Komplexität von ca. $2*10^6$ unterschiedlichen Varianten der PB-Sequenz.
Die *E.coli* wurden geerntet und die Plasmid DNA mit Hilfe des Maxi Prep Kit (Invitrogen) extrahiert. Im Anschluss an die Synthese wurden die PB mittels transienter Transfektion in Flp-In© 293 auf die Expression des DsRed untersucht. Im Fluoreszenzmikroskop konnte für die PB eine DsRed Expression und somit die Funktionalität des Konstrukts nachgewiesen werden.

5.6 Retroviraler Gentransfer der Peptidbibliothek

Der Gentransfer der Peptidbibliothek in die Reporterzellen erfolgte unter Verwendung von Retroviren, da diese Methode besonders effektiv zu einer stabilen Expression von Transgenen in Zielzellen führt. Dazu wurden die PB (pQCXIX PB) und ein für die Retrovirussynthese notwendiger pVSV-G Sicherheitsvektor in die Verpackungszelllinie GP2-293® transfiziert. Die produzierten Viruspartikel wurden dann mit den Reporterzellen inkubiert, um die PB in das Genom dieser Zellen dauerhaft zu integrieren. Für die Expression der PB in den Reporterzellen mussten folgende Arbeitsschritte und Techniken etabliert und optimiert werden:

- Virussynthese (Transfektionseffizienz der Verpackungszellen)
- Gentransfer (Transduktionseffizienz der Reporterzellen)

Als erstes wurde der Gentransfer der PB in die Verpackungszellen optimiert. Dazu war es notwendig, die Menge an Transfektionsagens, die richtige Zellzahl und die Menge der einzubringenden Plasmid DNA experimentell zu bestimmen. Aus sicherheitstechnischen Gründen wurde diese Optimierung ohne den für die Virussynthese notwendigen pVSV-G Vektor durchgeführt.

Zum Einbringen der DNA in die Verpackungszellen wurde das *CalPhos Mammalian Transfection System* (Clontech Laboratories) eingesetzt. Da das verwendete Transfektionsagens in höheren Konzentrationen zelltoxisch wirkte, wurde als optimale Menge ein Ansatzvolumen von 1200 µl ermittelt. Darauf abgestimmt ergaben sich für 10 cm Zellkulturschalen (TPP) eine Zellkonfluenz von ca. 60-70 % und ein Einsatz von 18 µg Plasmid DNA. Zur indirekten Überprüfung des retroviralen Gentransfers der Peptidbibliothek während der Transfektion wurde die DsRed Expression genutzt. Fluorenszenzmikroskopische Aufnahmen dieser Zellen bewiesen eine effiziente Transfektion und Expression der eingebrachten Gensequenz (PB) (Daten nicht gezeigt).

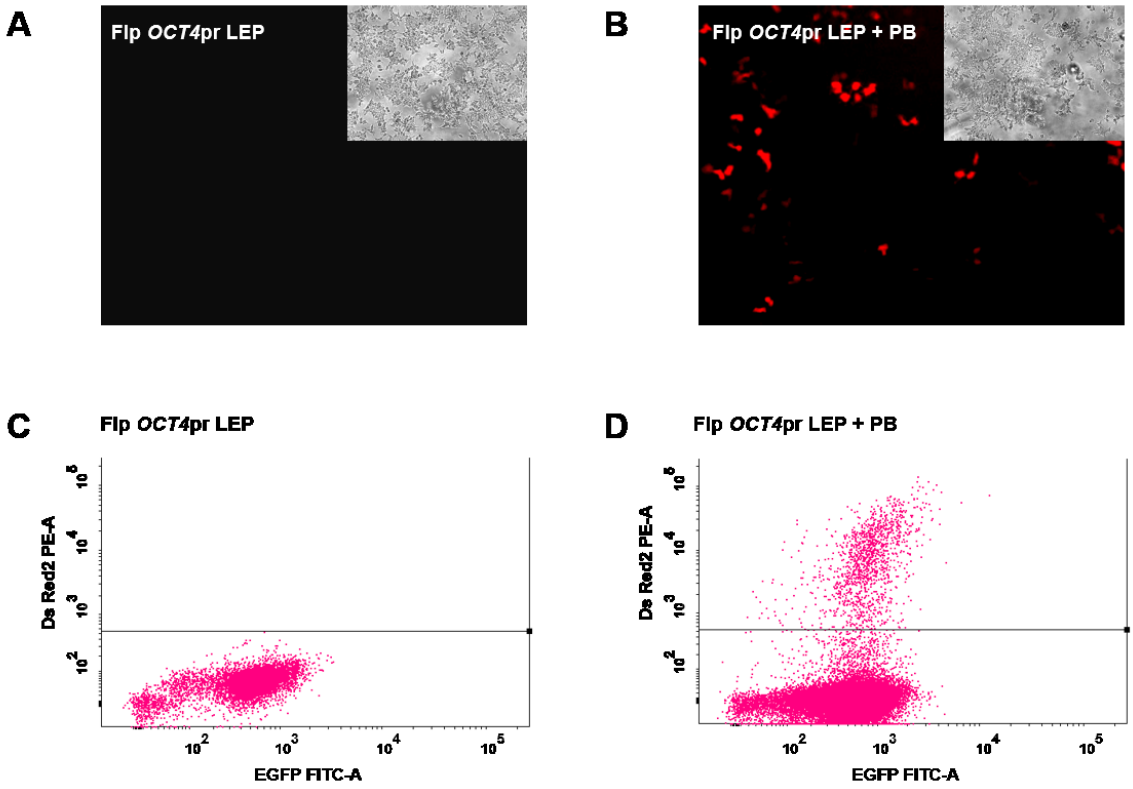

Abbildung 18: Retrovirale Transduktion

Dargestellt wird die DsRed Expression von retroviral transduzierten Flp *OCT4*pr LEP Zellen im Vergleich zu nicht transduzierten Kontrollzellen (Flp-In). Der Nachweis erfolgt mit Hilfe von (A, B) Mikroskopaufnahmen (Fluoreszenz und Durchlicht bei 200facher Vergrößerung) und (C, D) FACS-Analysen.

Im zweiten Schritt wurden die Reporterzellen mit dem Viruspartikeln transduziert. Nach der Infektion zeigten die Zellen eine eindeutige DsRed Expression. Die erfolgreiche Transduktion der Reporterzellen wurde sowohl mit Fluoreszenzmikroskopie als auch mit FACS-Analysen nachgewiesen (Abb. 18). Für eine genaue Quantifizierung wurden die FACS-Daten verwendet. In den Versuchen lag der Anteil von DsRed^{pos} Zellen für die Flp *OCT4*pr LEP Zelllinie ca. bei 5 %. Die Transduktionseffizenz war damit relativ gering und bedarf weiterer Optimierung.

5.7 Selektion aktivierter Zellen nach Transduktion der Peptidbibliothek

In den für die Flp *OCT4*pr LEP Zelllinie durchgeführten Screeningversuchen kamen zwei Selektionsstrategien zum Einsatz. Zum einen wurde mittels Antibiotikaselektion (Puromycin) und zum anderen mit Hilfe durchflußzytometrischer Methoden (FACS Analysen mit / ohne Zellsortierung) selektiert. Beide Verfahren lieferten gepoolte Mischpopulationen von Zellen, die eine vorangegangene Aktivierung des Reporters zeigten (Abb. 19 [I, III]). Neben den gewonnenen Mischpopulationen konnten auch monoklonale Zellpopulationen (Einzelklone) durch die Verwendung der Einzelzellsortierung im FACS selektiert werden (Abb. 19 [II]). Anschließend wurden aus diesen Zellpopulationen mittels *Rescue PCR* die Peptidsequenzen bestimmt (Abb. 19 [IV, V, VI]).

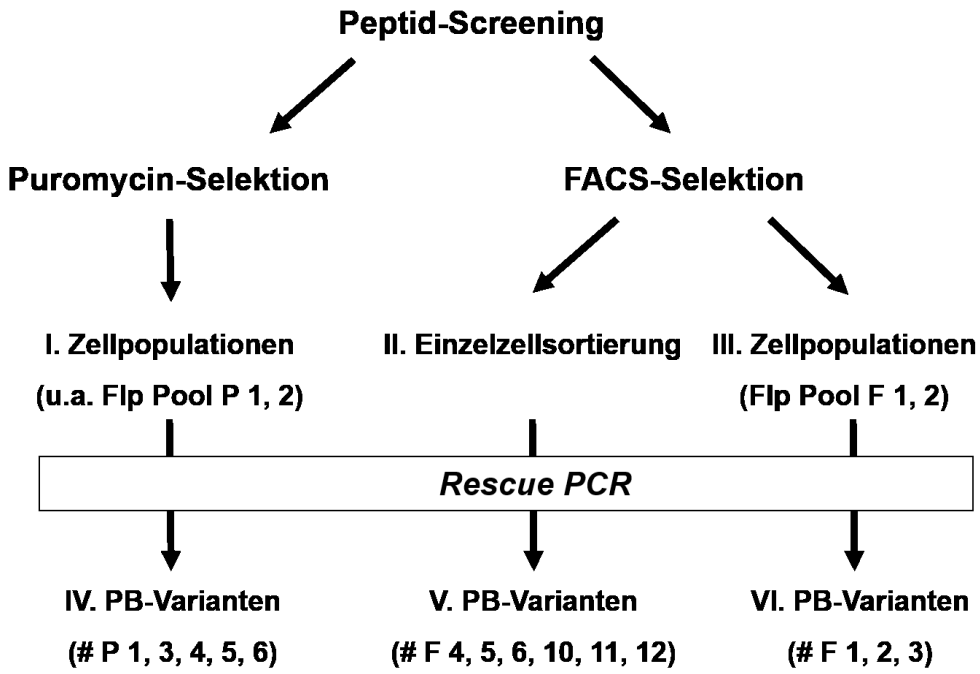

Abbildung 19: Screeningstrategien und Targetidentifizierung

Gezeigt wird eine Übersicht der Screeningstrategien zur Identifizierung putativer Targets (Varianten der Peptidbibliothek). Im Zuge der Versuche kamen die Puromycin- und die FACS-Selektion zum Einsatz. Bei beiden Strategien konnten Mischzellpopulationen (I, III) gewonnen und untersucht werden. Zusätzlich konnten durch Einzelzellsortierung im FACS (II) Einzelklone selektiert werden. Die jeweiligen Peptidsequenzen wurden mittels *Rescue PCR* (IV, V, VI) identifiziert. In Klammern ist die Klonnomenklatur angegeben.

5.7.1 Puromycinselektion

Die letale Puromycinkonzentration für die Flp *OCT4*pr LEP Zelllinie wurde im Vorfeld der Screeningversuche experimentell bestimmt und lag unter 12,5 µg Puromycin pro ml Selektionsmedium. Daher erfolgte die Selektion mittels Puromycin im Konzentrationsbereich zwischen 12,5–100 µg/ml. Es wurden die transduzierten Zellen mit den jeweiligen Konzentrationen für drei bis vier Wochen behandelt. Bei den Konzentrationen 50 und 100 µg/ml Puromycin wurden keine überlebenden Zellen detektiert. Im Fall der niedrigeren Selektionskonzentrationen nahm die Anzahl an Zellkolonien (Populationen) mit absteigender Puromycinkonzentration erwartungsgemäß zu. So konnten bei 12,5, 15, 20 und 25 µg/ml Puromycin aktivierte Zellen selektiert werden. Diese Zellen wurden nach der Selektion gepoolt und anschließend die genomische DNA für weiterführende Experimente (*Rescue PCR*) präpariert (Abb. 19 [I]). Weiterhin wurden die erhaltenen Zellen (Mischpopulationen)

im Luminometer und im FACS auf eine Induktion des Reporters untersucht. Die Ergebnisse der Luciferase-Assays zeigten für die Flp Pool P1 (15 µg/ml) Zellpopulation keine messbare Luciferaseaktivität. Diese Befunde konnten mit Hilfe der FACS-Analysen bestätigt werden. Diese Zellen zeigten eine mit den Kontrollzellen vergleichbare DsRed und EGFP Expression (Abb. 20 [A, C]). Daraus lässt sich für diese Zellpopulation eine transduktionsunabhängige Antibiotikaselektion ableiten (Abb. 20 [C]). Vergleichbare Effekte konnten ebenfalls bei initialen Screeningversuchen für die Flp *NANOG*pr LEP Reporterzelllinie beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

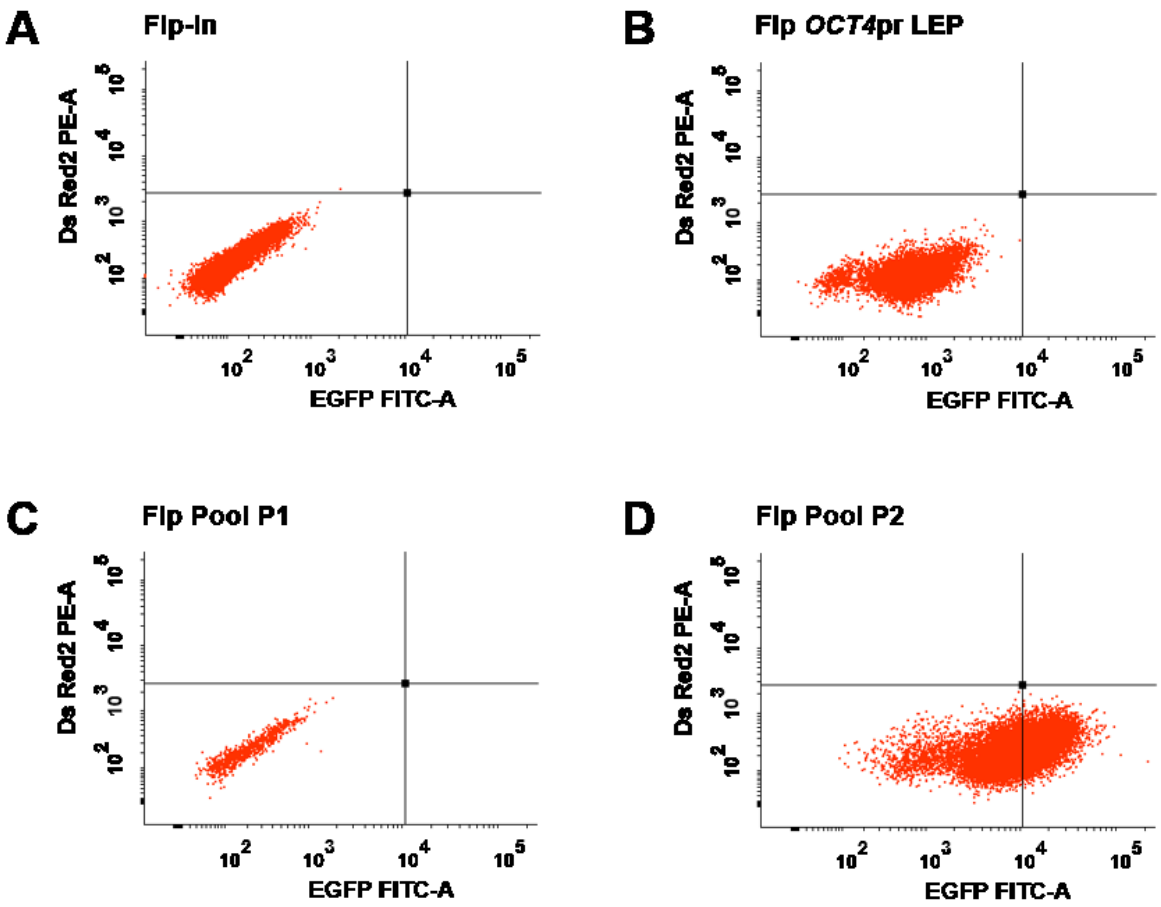

Abbildung 20: Selektion aktivierter Zellklone

Gezeigt werden die Ergebnisse der Puromycinselektion für Zellpopulationen retroviral transduzierter Flp *OCT4*pr LEP Zellen und für Flp-In Kontrollzellen mit Hilfe von (A-D) FACS-Analysen.

Dagegen zeigten die Untersuchung der Flp Pool P2 (25 µg/ml) Zellpopulationen im Luminometer eine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität um den Faktor 2,7 (p<0,001) im Vergleich zu den Kontroll-*OCT4* Reporterzellen (Abb. 21). Die FACS-Untersuchungen für diese Zellpopulationen ergaben eine EGFP Induktion (ca. Faktor > 10, jedoch keine messbare DsRed Expression (Abb. 20 [D])

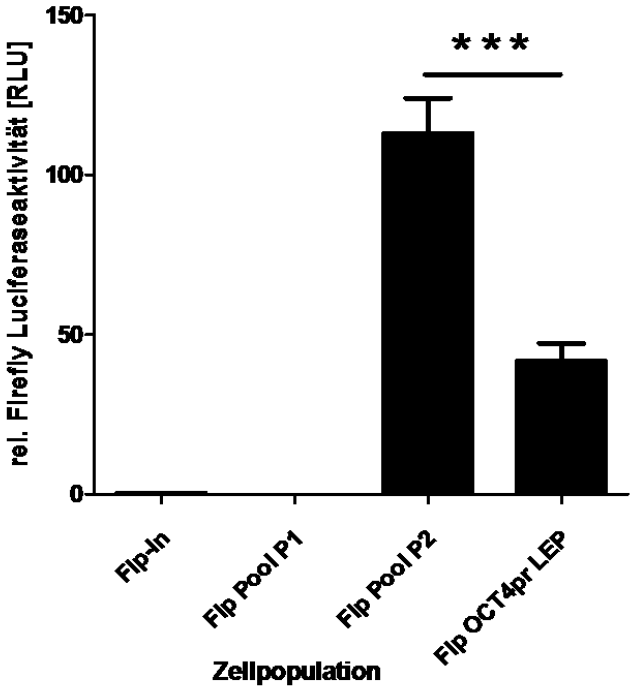

Abbildung 21: Puromycinselektion

Gezeigt werden die Ergebnisse von puromycinselektierten Zellpopulationen der retroviral transduzierten Flp *OCT4*pr LEP Zellen im Vergleich zu Flp-In und Flp *OCT4*pr LEP Kontrollzellen. Die Zellen wurden im Luciferase-Assay auf eine Aktivierung des Reportergens untersucht (Luciferaseaktivität normiert auf konstante Anzahl ausgesäter Zellen pro Well (p<0,001), (n=4).

5.7.2 FACS-Selektion

Im Gegensatz zur zeitintensiven Puromycinselektion konnten die Reporterzellen bereits wenige Tage nach Transduktion im FACS analysiert und/oder sortiert werden. Die Versuche ergaben eine PB-vermittelte Induktion des EGFP in einzelnen Reporterzellen (Abb. 22 [B, C Quadrant P4]). Nach Transduktion der Zellen betrug der Anteil an aktivierten $DsRed^{pos}$/ $EGFP^{pos++}$ Zellen ca. 0,02 % (Abb. 22 [C]). Die

FACS-Ergebnisse einer in einem Vorversuch nach DsRed^{pos} Zellen sortierten Zellpopulation zeigten erwartungsgemäß einen höheren Anteil aktivierter Zellen (ca. 0,2 %) (Abb. 22 [B]). Die aktivierten Reporterzellen wurden für weiterführende Experimente entweder als Einzelzellklone in 96 Well-Platten einsortiert oder als Zellpopulationen (DsRed^{pos}/EGFP^{pos++} Mischpopulation) kultiviert (Abb. 19 [II, III, V, VI]). Für die sortierten monoklonalen Zellklone (Einzelzellklonselektion) konnten in 21 der 288 Wells Zellen anwachsen (Abb. 19 [III, V]). Im Anschluss daran wurden die jeweiligen Peptidsequenzen mit Hilfe der *Rescue PCR* bestimmt.

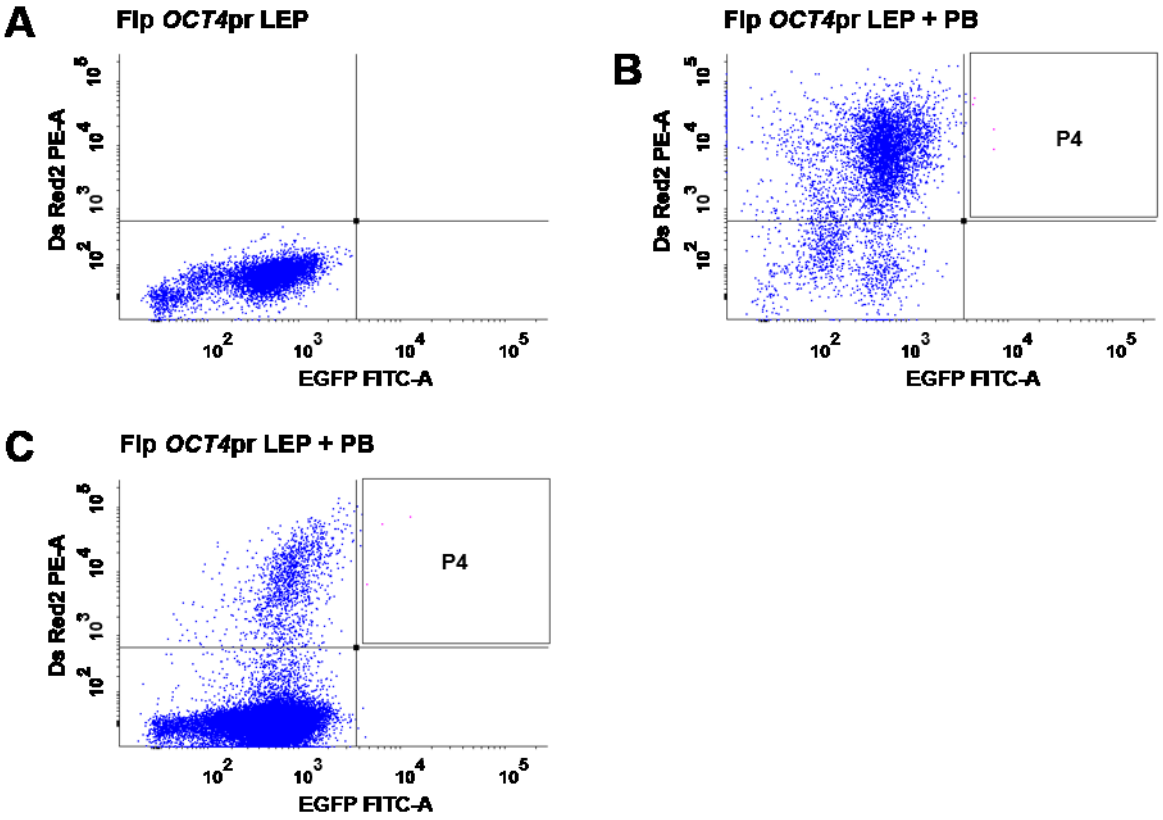

Abbildung 22: FACS-Selektion I

Dargestellt sind die Ergebnisse der FACS-Selektion von Flp *OCT4*pr LEP Zellen (A) und retroviral transduzierten Flp *OCT4*pr LEP Zellen (B, C). Bei (B) handelt es sich um Populationen retroviral transduzierter Zellen, die zuvor nach DsRed positiven Zellen sortiert wurden. Bei den aktivierten (sortierten) Zellklonen handelt es sich um die Subpopulation P4 (Quadrant oben rechts), (n=4).

Analog zu der Puromycinselektion wurden auch die FACS sortierten gepoolten Zellpopulationen im Luminometer untersucht. Die Populationen Flp Pool F1 und Flp Pool F2 (beide DsRed^{pos}/EGFP^{pos++} Mischpopulationen) zeigten im Luciferase-Assay eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu Kontrollzellen (Pool F1 Faktor ca. 1,8; Pool F2 Faktor ca. 1,7 ($p<0,01$)). Der Vergleich der Mischpopulationen untereinander ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 23).
Bei den FACS-Analysen waren ebenfalls DsRed negative Zellklone mit erhöhter GFP Aktivität zu beobachten. Diese Beobachtung unterstützt die These, dass nicht alle exprimierten Polypeptide DsRed markiert sind. Die Ursache dafür kann in einer Verschiebung des Leserahmens (*frame shift*) bei der Bibliotheksynthese liegen.

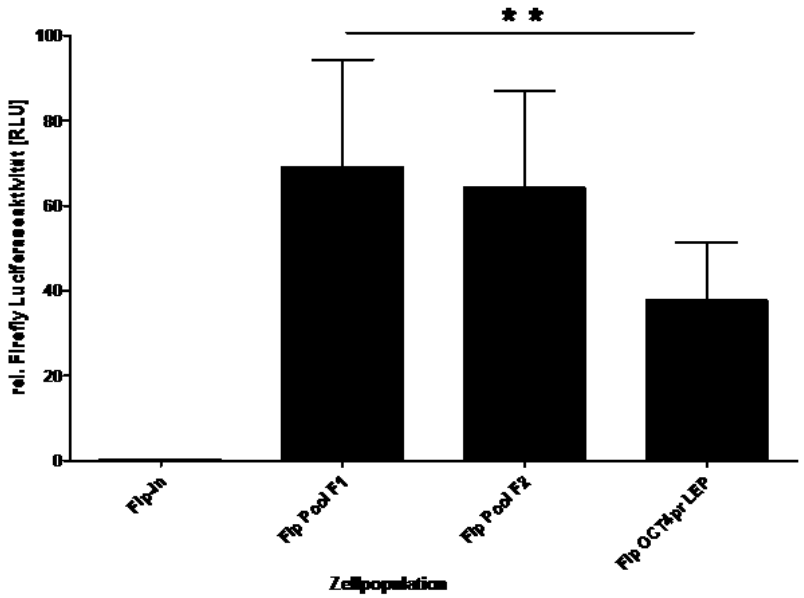

Abbildung 23: FACS-Selektion II

Gezeigt werden die Ergebnisse der FACS selektierten Zellpopulationen von retroviral transduzierten Flp *OCT4*pr LEP Zellen im Vergleich zu Flp-In und Flp *OCT4*pr LEP Kontrollzellen. Die Zellen wurden im Luciferase-Assay auf eine Aktivierung des Reportergens untersucht (Luciferaseaktivität normiert auf konstante Anzahl ausgesäter Zellen pro Well ($p<0,01$), ($n=4$).

5.8 *Rescue PCR* zur Identifizierung der Peptidsequenzen

Bei der Verwendung von retroviralen Expressionssystemen zum Gentransfer wird das Transgen stabil in das Genom der Zielzellen integriert. Somit kann die Sequenz mit Hilfe einer Rescue PCR identifiziert werden (Abb. 24 [A]).

Die Amplifikation der PB-Sequenzen erfolgte unter Verwendung einer *touchdown PCR* (Abb. 24 [B, C]). Diese Amplifikate wurden im Anschluss in den pQCXIX Basis Vektor kloniert. Durch Sequenzierung der Plasmide konnte die PB-Sequenz identifiziert (MWG Eurofins). Die *Rescue PCR* lieferte sowohl für die Puromycin- als auch für die FACS Selektion putative DNA-Sequenzen der Peptidbibliothek. Diese putativen Sequenzen wurden für weiterführende Untersuchungen *in silico* translatiert (Tab. 10).

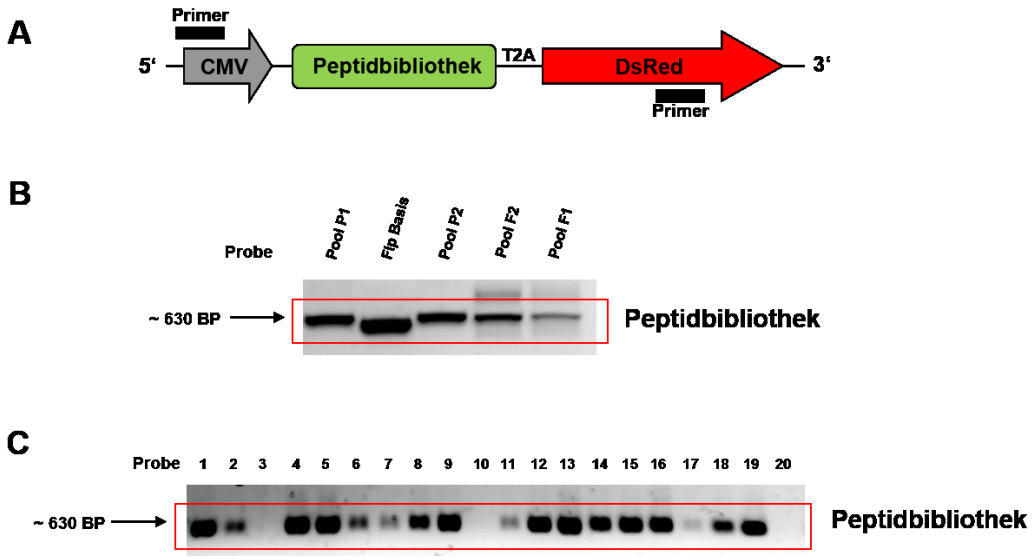

Abbildung 24: *Rescue PCR*

Gezeigt werden (A) der schematische Aufbau des PB Konstrukts mit den Primer-Bindungsstellen (Primer 1/2) und (B, C) die Produkte (Ergebnisse) der *Rescue PCR* für unterschiedliche, (B) selektierte Zellpopulationen und (C [Probe 1-20]) im FACS sortierte Einzelzellklone auf einem 1 %igen Agarose-Gel. Die Expression der PB wird durch eine Bande bei ca. 630 Bp angezeigt. Die PCR zeigt für die (B) Flp Basis Zellen (Konstrukt ohne PB) eine die Bande bei ca. 600 Bp.

Tabelle 10: Peptidsequenzen von Einzelklonen

Es sind die *in silico* translatierten Peptidsequenzen von ermittelten Einzelklonen dargestellt (randomisierte PB Sequenzen).

Klon (PB Variante)	Pepetidesequenz		
Peptidbibliothek			
Konstrukt	NH_2 – **MG**	**XXXXXXXXXX**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
Kontrollsequenzen			
# K1	NH_2 – **MG**	**CVLQAQRALA**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# K2	NH_2 – **MG**	**CIRNSLMPYM**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
Puromycinselektion			
# P1	NH_2 – **MG**	**HGIPGVCGMR**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# P2 / # P4	NH_2 – **MG**	**AGTCQLRAAR**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# P3	NH_2 – **MG**	**Y***	– COOH
# P5	NH_2 – **MG**	**MNEVLRRVGH**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# P6	NH_2 – **MG**	**DRGVQIGSCS**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
FACS-Selektion			
# F1	NH_2 – **MG**	**AG**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# F2	NH_2 – **MG**	**HREWMSALPG**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# F3	NH_2 – **MG**	**IGSG***	– COOH
# F4	NH_2 – **MG**	**HSLWVEGWLT**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# F5	NH_2 – **MG**	**FPFLSLSGAT**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# F6	NH_2 – **MG**	**LARSLDATMG**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# F7 / # F9	NH_2 – **MG**	**LGMCEWQRGS**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# F10	NH_2 – **MG**	**VILRFRLGLW**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# F11	NH_2 – **MG**	**SSVPRVRSLA**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH
# F12	NH_2 – **MG**	**TWLHQSKFVG**	**GGPPHGVHHHHHH** – COOH

5.9 Validierung der Screeningergebnisse

In einem primären Screeningversuch konnten Polypeptidsequenzen mit aktivierender Wirkung auf den humanen *OCT4* Promotor aus einer randomisierten Peptidbibliothek identifiziert werden. Diese putativen Targets wurden in weiterführenden Experimenten verifiziert und validiert.
Die Validierungsexperimente erfolgten unter Verwendung von Plasmiden mit monoklonalen Varianten der PB in dem pQCXIX Basis Vektor. Diese Einzelklone wurden in transienten Luciferase-Assays auf eine Aktivierung des Reporters untersucht. Dafür wurden Flp *OCT4*pr LEP Zellen mit den Plasmiden transfiziert und 20 bzw. 42 Stunden nach Transfektion (hnT) im Luminometer analysiert (Abschnitt 4.3.2).

5.9.1 Validierung der Ergebnisse nach der Puromycinselektion

Aus der Zellpopulation Flp Pool P1 konnten durch die *Rescue PCR* zwei Einzelklone identifiziert werden. Die anschließenden Untersuchungen ergaben nur bei einem Klon (# P3) eine signifikante Erhöhung des Luciferasesignals 20 hnT (Faktor 1,2) im Vergleich zu Kontrollzellen ($p \leq 0{,}001$) (Abb. 25 [A]).
Die *Rescue PCR* lieferte für die Zellpopulation Flp Pool P2 eine Vielzahl putativer Targets. Von diesen wurden zunächst drei in weiterführenden Experimenten untersucht (Abb. 19 [II, V]). Dabei zeigten zwei von drei Klonen eine signifikante Luciferaseinduktion bei 20 bzw. 42 hnT ($p \leq 0{,}001$). Die Luciferaseaktivierung bei dem Klon # P5 lag an beiden Zeitpunkten ca. bei Faktor 2 im Vergleich zum Basiskonstrukt (Abb. 25 [B, C]).

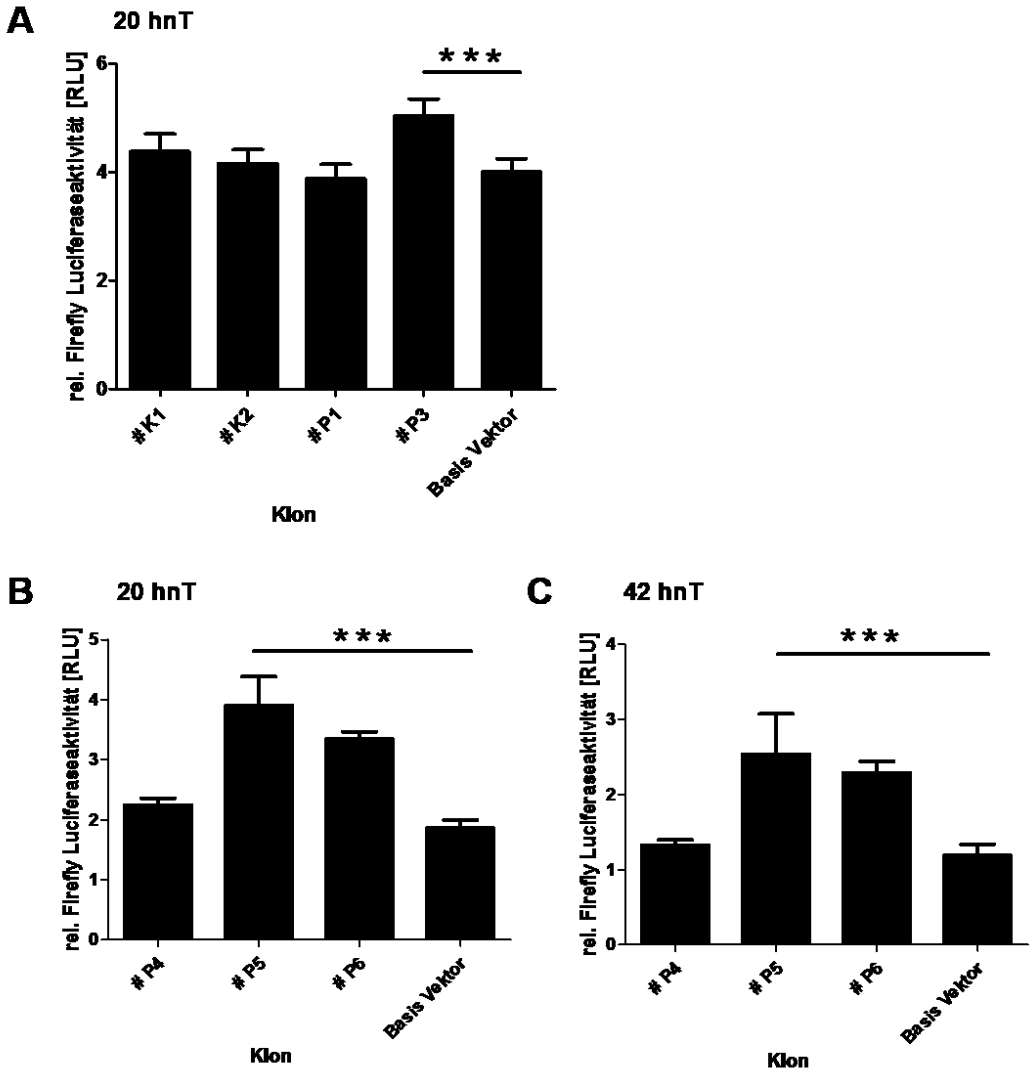

Abbildung 25: Validierung von Einzelklonen nach der Puromycinselektion

Dargestellt werden die Ergebnisse der Validierungsexperimente von Flp *OCT4*pr LEP Zellen, die mit Einzelklonen oder dem Basis Konstrukt für transiente Luciferase-Assays transfiziert wurden. Anschließend wurden die Zellen 20 h (A, B) bzw. 42 h (C) nach der Transfektion im Luminometer auf eine Aktivierung der Luciferase untersucht (Luciferaseaktivität normiert auf konstante Anzahl ausgesäter Zellen pro Well ($p<0,001$), ($n=4$)).

5.9.2 Validierung der Ergebnisse nach der FACS-Selektion

Im Gegensatz zur Puromycinselektion konnte mit dem FACS eine ganze Reihe putativer PB Varianten schnell und einfach identifiziert werden.

Aus der Zellpopulation Flp Pool F1 wurden mit Hilfe der *Rescue PCR* drei putative Varianten der PB ermittelt (Abb. 19 [IV, VI]). Von denen zeigten alle Klone eine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität bei 20 hnT und zwei von drei bei 42 hnT

(p≤0,001). Die stärkste Reporterinduktion um den Faktor 2,7 im Vergleich zum Basiskonstrukt war bei dem Klon # F2 bei 42 hnT zu beobachten (Abb. 26 [A, B]).

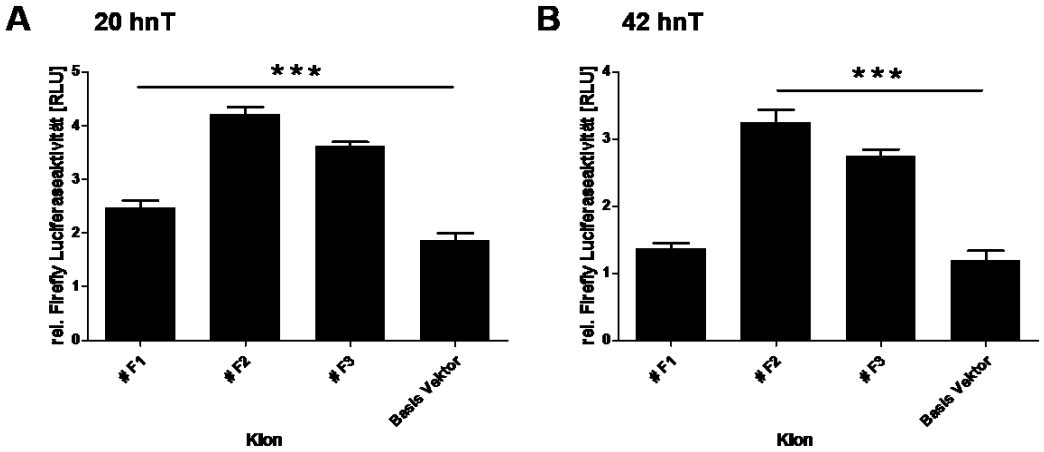

Abbildung 26: Validierung von Einzelklonen nach der FACS-Selektion I

Dargestellt wird die aktivierende Wirkung einzelner Varianten der PB auf das Reporterkonstrukt in transienten Luciferase-Assays. Dafür sind Flp *OCT4*pr LEP Zellen mit Einzelklonen oder dem Basis Konstrukt transfiziert worden. Im Anschluss daran wurden die Zellen 20 h (A) bzw. 42 h (B) nach der Transfektion im Luminometer analysiert (Luciferaseaktivität normiert auf konstante Anzahl ausgesäter Zellen pro Well (p<0,001), (n=4)).

5.9.3 Validierung der Ergebnisse nach der Einzelzellsortierung

Durch die FACS-Selektion mit anschließender Einzelzellsortierung wurden sieben Varianten der PB für weiterführende Experimente gewonnenen (Abb. 19 [VI]). Die Validierungsversuche ergaben für alle sieben untersuchten Klone eine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität bei 20 hnT. Nach 42 hnT zeigten fünf der sieben Klone eine signifikante Luciferaseerhöhung (p≤0,001). Im Detail lag die Aktivierung der Luciferase für die Klone # F4, # F7 und # F8 nach 42 hnT ca. bei Faktor 2 im Vergleich zum Basis Konstrukt. Darüber hinaus war nur bei zwei der untersuchten Klone (# F9 und # F11) keine zeitabhängige Verstärkung der Reporterinduktion zu beobachten (Abb. 27 [A, B]).

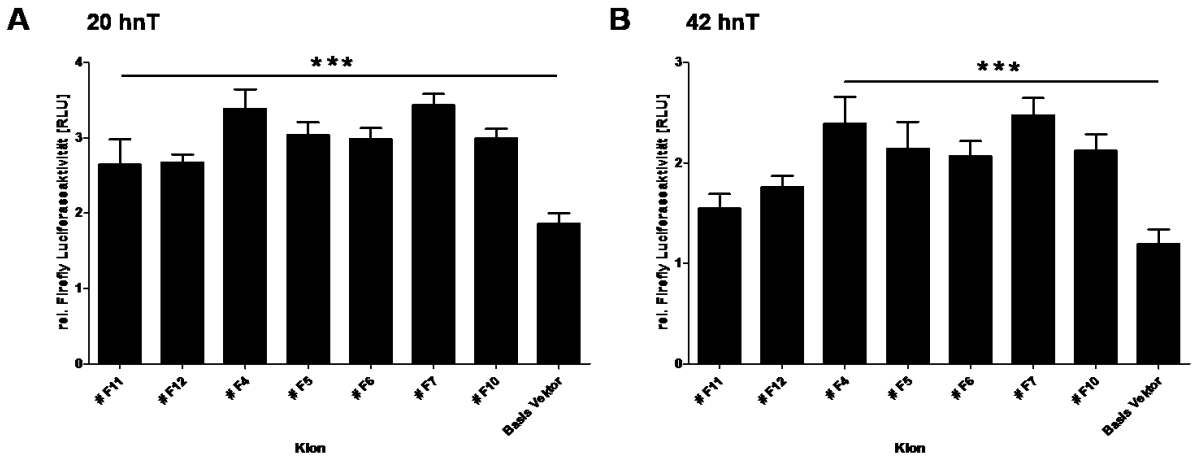

Abbildung 27: Validierung von Einzelklonen nach der FACS-Selektion II

Dargestellt werden die Ergebnisse der Validierungsexperimente für Varianten der PB in Bezug auf eine Aktivierung des Reporters in transienten Luciferase-Assays. Dafür wurden Flp *OCT4*pr LEP Zellen mit Einzelklonen oder dem Basis Konstrukt transfiziert. Im Anschluss daran wurden die Zellen 20 h (A) bzw. 42 h (B) nach der Transfektion im Luminometer analysiert (Luciferaseaktivität normiert auf konstante Anzahl ausgesäter Zellen pro Well ($p<0,001$), ($n=4$)).

5.10 Bioinformatische Auswertungen putativer Targets

5.10.1 *In silico* Translation putativer Targets

Es konnten unterschiedliche Varianten der Peptidbibliothek identifiziert werden. Die gewonnenen DNA-Sequenzen der Einzelklone wurden anschließend *in silico* translatiert (Tab. 10) und weiter untersucht. Der Großteil der sequenzierten Polypeptide zeigte den erwarteten Aufbau des Bibliothekkonstrukts mit randomisierter Sequenz und flankierendem PB *backbone* (pQCXIX Basis PB).

Durch das Auftreten von Stoppcodons waren bei einigen der gewonnenen PB-Sequenzen auch verkürzte Varianten zu beobachten (Tab. 10; z.B. bei # F1 und # F3). Ebenfalls konnten Verschiebungen des Leserahmens gezeigt werden (Abb. 28).

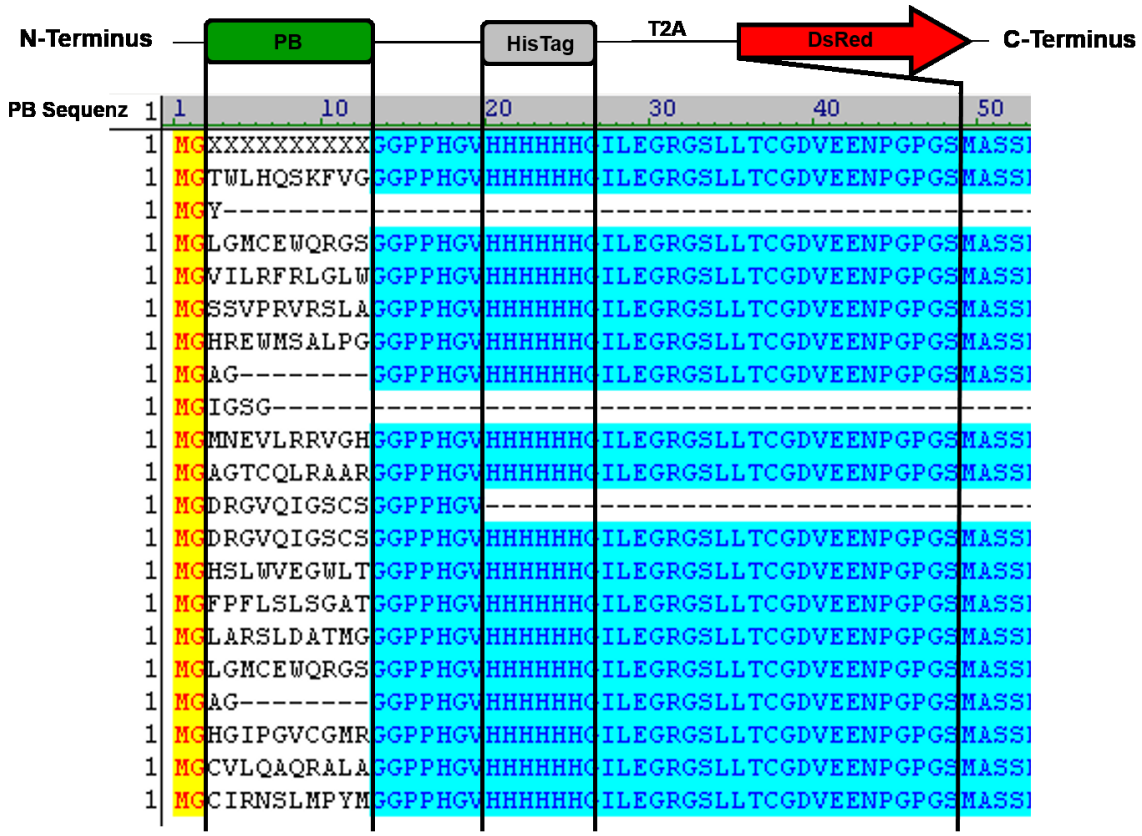

Abbildung 28: Protein-Sequenzalignments

Gezeigt werden der schematischen Aufbau des PB-Konstrukts und die Protein-Sequenzalignments für eine Auswahl der identifizierten Varianten (Einzelklone) der Peptidbibliothek.

5.10.2 Sequenzhomologieanalyse (BLAST-Analyse)

Einzelne Peptidaptamere (Polypeptide) können in der Lage sein, Zielstrukturen spezifisch und selektiv zu erkennen und zu binden. Die im Screening beobachteten Effekte können durch die Aminosäuresequenz (Primärstruktur der Pa) bedingt sein. Aus diesem Grund ist die Analyse von Sequenzhomologien eine wirksame Methode, um die potentiellen molekularen peptid-vermittelten Abläufe besser verstehen zu können.

Es wurden für die drei Targets # P5, # P6 und # F2 BLAST-Analysen durchgeführt (*Basic Local Alignment Search Tool*; http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). Bei diesen Auswertungen werden die Aminosäuresequenzen mit in der NCBI-Datenbank (*National Center for Biotechnology Information*) annotierten Proteinsequenzen verglichen und putative Proteine mit hoher Sequenzhomologie identifiziert. Diese Analysen lieferten mehrere mögliche Targetproteine mit hoher Sequenzhomologie.

Unter den identifizierten Targets waren z.B. Proteine wie *HOXA1*, *KBRAS1*, *DCLK1* und *NSD3L*. Bemerkenswert ist, dass einige der Proteine in der Literatur im Zusammenhang mit Zellteilungsprozessen, Stammzellen oder Tumorerkrankungen beschrieben wurden (Lin et al. 2012, Delval et al. 2011, Tsou et al. 2012, Sureban et al. 2013, Nakanishi et al. 2013, Zhou et al. 2010) (Abb. 29).

Klon # P6

gene HOXA1 protein - human
Sequence ID: pir|||39193 Length: 132 Number of Matches: 1
▶See 3 more title(s)

Range 1: 52 to 58 GenPept Graphics ▼Next Match ▲Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
24.0 bits(49)	7.1	7/7(100%)	7/7(100%)	0/7(0%)

```
Query  2   RGVQIGS  8
           RGVQIGS
Sbjct  52  RGVQIGS  58
```

NF-kappa-B inhibitor-interacting Ras-like protein 2 isoform c [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_001138401.1| Length: 97 Number of Matches: 1

Range 1: 50 to 68 GenPept Graphics ▼Next Match ▲Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
19.3 bits(38)	232	9/19(47%)	9/19(47%)	9/19(47%)

```
Query  1   DRGV--QIG-------SCS  10
           DRGV  QI        SCS
Sbjct  50  DRGVREQIAESLFSVWSCS  68
```

histone-lysine N-methyltransferase NSD3 isoform short [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_060248.2| Length: 645 Number of Matches: 1
▶See 7 more title(s)

Range 1: 622 to 628 GenPept Graphics ▼Next Match ▲Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
19.7 bits(39)	171	7/8(88%)	7/8(87%)	1/8(12%)

```
Query  1   DRGVQIGS  8
           DRGVQ GS
Sbjct  622 DRGVQ-GS  628
```

Klon # P5

serine/threonine-protein kinase DCLK1 isoform 3 [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_001182345.1| Length: 433 Number of Matches: 1

Range 1: 128 to 138 GenPept Graphics ▼Next Match ▲Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
21.8 bits(44)	35	8/11(73%)	8/11(72%)	2/11(18%)

```
Query  2   NEV--LRRVGH  10
           NEV  LRRV H
Sbjct  128 NEVSILRRVKH  138
```

cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog isoform 1 [Homo sapiens]
Sequence ID: ref|NP_510870.1| Length: 410 Number of Matches: 1
▶See 7 more title(s)

Range 1: 402 to 408 GenPept Graphics ▼Next Match ▲Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
23.1 bits(47)	14	7/8(88%)	7/8(87%)	1/8(12%)

```
Query  1   MNEVLRRV  8
           MNE LRRV
Sbjct  402 MNE-LRRV  408
```

Klon # F2

unnamed protein product [Homo sapiens]
Sequence ID: dbj|BAG61721.1| Length: 430 Number of Matches: 1

Range 1: 268 to 275 GenPept Graphics ▼Next Match ▲Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
24.4 bits(50)	5.6	6/8(75%)	7/8(87%)	0/8(0%)

```
Query  2   REWMSALP  9
           REW+S LP
Sbjct  268 REWLSTLP  275
```

MEGF2 [Homo sapiens]
Sequence ID: dbj|BAA32464.1| Length: 1364 Number of Matches: 1

Range 1: 1202 to 1209 GenPept Graphics ▼Next Match ▲Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
24.4 bits(50)	5.7	6/8(75%)	7/8(87%)	0/8(0%)

```
Query  2    REWMSALP  9
            REW+S LP
Sbjct  1202 REWLSTLP  1209
```

cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog, Drosophila) [Homo sapiens]
Sequence ID: gb|EAW64914.1| Length: 3037 Number of Matches: 1

Range 1: 2875 to 2882 GenPept Graphics ▼Next Match ▲Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
24.4 bits(50)	5.7	6/8(75%)	7/8(87%)	0/8(0%)

```
Query  2    REWMSALP  9
            REW+S LP
Sbjct  2875 REWLSTLP  2882
```

Abbildung 29: BLAST-Analysen ausgewählter Polypeptide

Dargestellt wird eine Auswahl von Sequenzalignments (BLAST-Analyse; http://.www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) für drei identifizierte Polypeptide (Klone # P5, # P6 und # F2). Mit Hilfe dieser Analysen wurden mögliche Targetproteine mit hoher Sequenzhomologie identifiziert.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss kurzer Polypeptide auf die Expression stammzell-assoziierter Gene untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein vielseitig einsetzbares promotorabhängiges Screeningsystem in der humanen embryonalen Nierenzelllinie Flp-In® 293 entwickelt (Abb. 8). Besonders im Fokus standen dabei die Etablierung und Optimierung einzelner Methoden und wichtiger Teilbereiche des Screeningsystems (Abb. 8; [3-6]). Als *proof of principle* konnten aus einer kombinatorischen biologischen Bibliothek für den humanen *OCT4* Promotor aktivierende Polypeptide identifiziert werden. Diese Polypeptide wurden in anschließenden Validierungsexperimenten verifiziert (Abschnitt 5.7 - 5.10).

6.1 HEK-Zell-basierte Reportersysteme

Die Identifizierung neuer biologisch aktiver Substanzen ist besonders in der pharmakologischen Forschung interessant. Oftmals kommen dabei zellbasierte Assaysysteme zum Einsatz, die mit Hilfe von Reportergenen arbeiten.
Die erfolgreiche Etablierung solcher Systeme erfordert die Erfüllung folgender Kriterien (Jackson und Harrington 2005, Fribley et al. 2011):

- vielseitige Einsetzbarkeit
- einfache und kostengünstige Handhabung
- schnelle und robuste Messbarkeit (*readout*)
- hohe Screeningeffizienz
- Einsetzbarkeit im Hochdurchsatzformat
- physiologische Relevanz der Ergebnisse

Für die Etablierung eines promotorabhängigen Screeningystems eignet sich die genetisch modifizierte humane HEK 293 Nierenzelllinie (Graham et al. 1977). Diese und die verwandte Flp-In® 293 Zelllinie stellen ein gutes *in vitro* Modell dar, weil für beide eine Vielzahl von molekularbiologischen, biochemischen und genetischen Methoden beschrieben worden ist. Dazu zählen unter anderen die Expression von Transgenen mittels Transfektion und die Generierung stabiler Zelllinien. Zudem ist

die Verwendung von unterschiedlichen Reporterenzymen in HEK 293 Zellen möglich. Durch ihre kostengünstige und einfache Kultivierung sind sie ideal für die Durchführung von HTS. Deshalb dienten sie in dieser Arbeit als Grundlage zur Entwicklung eines promotorabhängigen Screeningverfahrens (Cash et al. 2013, Kain und Ganguly 2001, Auld et al. 2008b, Thomas und Smart 2005, Paguio et al. 2010, Auld et al. 2008a). Generell ist zu bemerken, dass *in vitro* Modellsysteme trotz aller Vorzüge artifiziell sind. Somit lassen sich die gewonnenen Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf die realen Prozesse übertragen. Aus diesem Grund sollten die in einem Screening identifizierten Targets in weiterführenden Versuchen auf ihre physiologische Wirkung untersucht werden (Thomas und Smart 2005).

6.2 Reporterkonstrukt

Wie bereits erwähnt sind eine Reihe unterschiedlicher Reporterenzyme in HEK Zellen einsetzbar (Kain und Ganguly 2001). Die Verwendung mehrerer Enzymaktivitäten in multifunktionellen Reporterkonstrukten ermöglichte dabei unterschiedliche Screening- sowie Selektionsstrategien und somit einen flexiblen Einsatz des Assaysystems. Aus diesem Grund wurde ein tri-funktionelles Reporterkonstrukt (LEP Reporter) bestehend aus der Firefly Luciferase, dem EGFP und der Puromycinresistenz entworfen und erstellt. Hierbei wurde das EFGP für eine FACS-basierte und die Puromycinresistenz für eine Antibiotika-basierte Selektion verwendet. Die Firefly Luciferase zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und große dynamische Breite des Messbereiches aus. Darum wurde sie für die Durchführung der Validierungsexperimente ausgewählt (Paguio et al. 2010, Fan und Wood 2007).

Die äquimolare und simultane Expression der Reporterenzyme ist für das Screening von großer Bedeutung. Sie kann durch die Verwendung von Fusionsproteinen erreicht werden. Dabei werden mehrere Proteine durch Linkersequenzen verbunden. Diese Proteine können aber durch ihre räumliche Nähe miteinander interagieren und sich gegenseitig stören (Lu et al. 2005, Paulmurugan und Gambhir 2005).

Eine andere verbreitete Methode zur Koexpression von Transgenen sind IRES Elemente. In diesem Fall werden die einzelnen Enzyme mit unterschiedlicher

Effizienz translatiert. Deshalb kann im Gegensatz zu Fusionsproteinen kein unimolares Expressionsverhältnis sichergestellt werden (Hu et al. 2009).
Zur Lösung dieser Probleme kamen bei der Erstellung des LEP-Reporters virale 2A Peptide zum Einsatz. Dabei wurde das gesamte Konstrukt als ein Polyprotein exprimiert und posttranslationell proteolytisch prozessiert. Somit wurden alle Reporterenzyme äquimolar synthetisiert und lagen als individuelle Proteine vor. Der Gebrauch der 2A Peptide erforderte eine äußerst sorgfältige Planung und Durchführung aller einzelnen Klonierungsschritte, da das gesamte Konstrukt in einem ORF exprimiert werden musste. Eine Verschiebung des Leserahmens bei der Klonierung hätte die Expression von nicht funktionalen Reporterenzymen zur Folge (Hu et al. 2009, Donnelly et al. 2001b, Donnelly et al. 2001a).

6.3 Stabile Reporterzelllinien

Promotorabhängige Screeningsysteme finden vor allem bei Transkriptions- und Translationsanalysen Verwendung. Diese Versuche sind einfach und schnell durchzuführen. Oft werden damit direkte Protein-Protein- oder Nukleinsäure-Protein-Wechselwirkungen untersucht. Für diese Fragestellungen sind zeitlich begrenzte transiente Expressionssysteme ausreichend. Bei einer peptid-vermittelten Expressionsinduktion handelt es sich jedoch nicht zwangsläufig um direkte Effekte. Speziell die Verwendung von Selektionsantibiotika erfordert eine dauerhafte und gleichbleibende Expression der Reporterkonstrukte in den Reporterzellen (Paguio et al. 2010, Thompson et al. 1991). Demzufolge war die Generierung von stabilen Reporterzellen zweckmäßig. Darüber hinaus reduzieren stabile Zelllinien den experimentellen Aufwand der Versuche und erlauben einen flexibleren Einsatz des Testsystems.

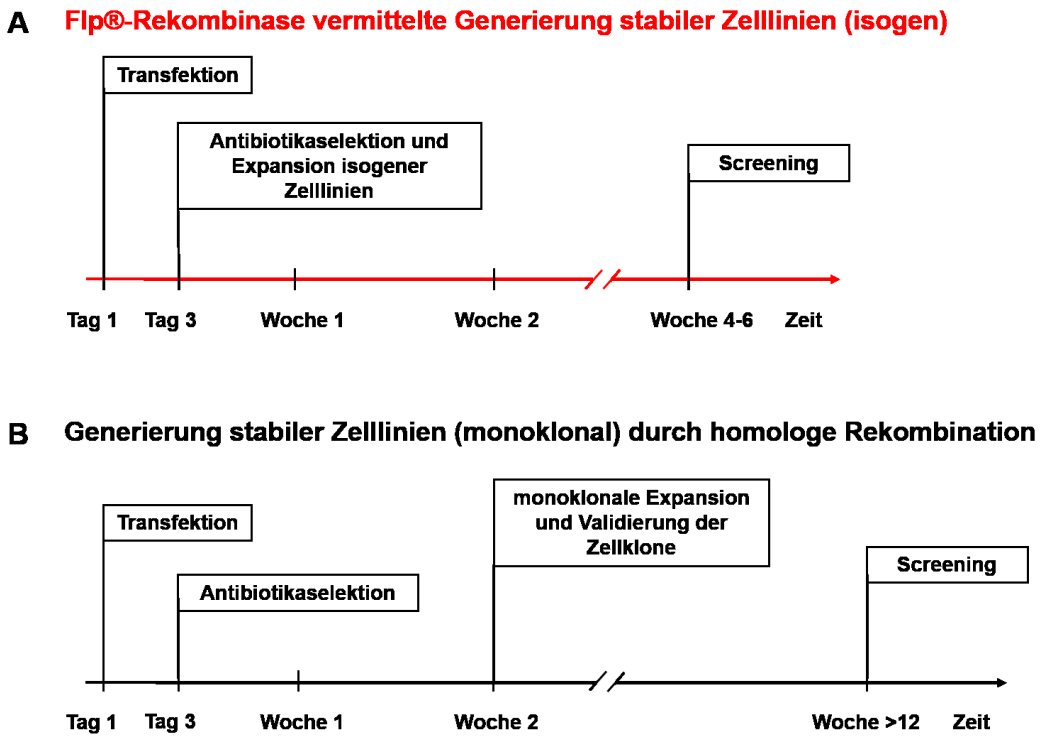

Abbildung 30: Strategien zur Generierung stabiler Zelllinien

Die schematische Darstellung zeigt zwei mögliche Strategien für die Generierung stabiler Zelllinien. Die Verwendung des (A) Flp®-Rekombinase-Systems (Invitrogen) ermöglicht einen großen Zeitgewinn gegenüber (B) dem traditionellen Verfahren der homologen Rekombination. Die in der Abbildung angegebenen Zeiten sind von den verwendeten Zelllinien abhängig und können stark differieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden die stabilen Zelllinien mit Hilfe des Flp-In® Systems (Invitrogen) erstellt. Dabei wurde die Integration des Reporterkonstrukts in das Wirtsgenom der Zellen durch die Flp-Rekombinase vermittelt. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist die große Zeitersparnis im Vergleich zur Herstellung stabiler Zelllinien durch homologe Rekombination (Abb. 30).

Die chromosomale Lokalisation der Transgene ist bedeutend für deren Expression. Im Fall der verwendeten Flippase-vermittelte Zellliniengenerierung erfolgte die Integration an einer definierten Position im Genom der Zellen, was eine deutlich erhöhte Reproduzierbarkeit des Assaysystems gewährleistete (Kain und Ganguly 2001).

Mit Hilfe von Southern Blot Analysen wurde für jede erstellte Flp-In Zelllinie eine vollständige Integration der Konstrukte in das Wirtsgenom nachgewiesen (Abschnitt 5.4). Im Vergleich zu konventionell generierten Zelllinien (homologe Rekombination)

war der Anteil an falsch-positiven Zellklonen, bei denen entweder kein oder nur ein Teil des Konstrukts ins Genom integriert wurde, um ein Vielfaches geringer. Folglich musste nur ein Bruchteil von Zelllinien im Southern Blot verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache minimierte zusätzlich den zeitlichen und experimentellen Aufwand der Zelllinienherstellung (Abb. 16).

6.4 Einsatz promotorabhängiger Screeningsysteme

Durch den Einsatz von promotorabhängigen Screeningsystemen können Substanzen ermittelt werden, die in Lage sind, die Expression von Zielgenen zu regulieren. So konnten zum Beispiel unter Verwendung eines solchen Assays große *small molecule* Bibliotheken untersucht werden. Im Zuge dessen wurden Substanzen identifiziert, die die Expression des stammzell-assoziierten Gens *OCT4* induzieren (Li et al. 2012). Um große und komplexe Bibliothek in kurzer Zeit zu analysieren, müssen die Versuche in miniaturisiertem Maßstab im Hochdurchsatzformat durchführbar sein (Davis et al. 2002, Inglese et al. 2006, Siebring-van Olst et al. 2013, Fan und Wood 2007, Fribley et al. 2011). In Anbetracht dessen eignet sich diese Assayform auch zur Identifizierung von expressionsmodulierenden Polypeptiden aus einer randomisierten Peptidbibliothek. Deshalb wurde ein promotorabhängiges Verfahren als Basis für das etablierte Screeningsystem gewählt.

6.5 Interpretation der Ergebnisse promotorabhängiger Assaysysteme

Wie beschrieben besitzen zellbasierte HTS-Reportergenassays zur Untersuchung von *small molecule* Bibliotheken große Gemeinsamkeiten mit dem in der Arbeit etablierten Screeningverfahren. Aus diesem Grund sind wesentliche Schlussfolgerungen bei der Interpretation der Ergebnisse auf die im Screening gewonnenen Resultate übertragbar. Die Durchführung von Reportergenassays liefert oft eine große Anzahl von falsch-positiven sowie falsch-negativen Resultaten, was zu verzerrten Ergebnissen führt (Crisman et al. 2007, Auld et al. 2008a, Auld et al. 2009). Dieser Umstand war besonders bei der Puromycinselektion in den durchgeführten Screeningversuchen (PB-Screening) zu beobachten. Eine Ursache

dafür kann in einer direkten Interaktion der Polypeptide mit den Reporterenzymen begründet sein (Thompson et al. 1991, Crisman et al. 2007). So wäre u.a. eine promotorunabhängige polypeptid-vermittelte Stabilisierung der Reportergene denkbar (Welch et al. 2007, Thompson et al. 2008). Diese Regulation kann entweder auf mRNA- oder auf Proteinebene erfolgen, wobei die Interaktion der Polypeptide mit dem Reporterenzym zu einer verlangsamten Degradation des Reporters führt. Die daraus resultierende Akkumulation würde folgerichtig eine erhöhte Aktivität des Enzyms hervorrufen. Analog dazu sind auch polypeptid-vermittelte destabilisierende Effekte möglich (Hargrove und Schmidt 1989). Detailliert sind Stabilisierungseffekte für die Firefly Luciferase und das EGFP beschrieben worden (Auld et al. 2008a, Auld et al. 2009, Simeonov et al. 2008, Auld et al. 2008b, Thompson et al. 1991). Jedoch ist eine gleichgerichtete, polypeptid-vermittelte, promotorunabhängige Aktivierung von mehreren Reporterenzymen äußerst unwahrscheinlich. Aus diesem Grund kamen im Verlauf der Validierungsexperimente für die mittels FACS- und Antibiotika-Selektion identifizierten Polypeptide Luciferase-Assays zum Einsatz (Auld et al. 2009). Somit konnten durch den Einsatz des tri-funktionellen Reporterkonstrukts promotorunabhängige Einflüsse minimiert werden.

Für die Firefly Luciferase kommt zusätzlich erschwerend hinzu, dass die Luminometermessungen der Enzymaktivität äußerst abhängig von der Zellzahl sind. Daher werden bei luciferase-basierten Reportergenassays oft duale Luciferase Systeme verwendet (Paguio et al. 2010, Mrowka et al. 2007). Bei diesen Assays wird die promotorabhängige Firefly Luciferase mittels konstitutiv exprimierter Renilla Luciferase normiert. Die Zellen werden lysiert und beide Luciferaseaktivitäten getrennt voneinander gemessen.

Die Validierung der Screeningergebnisse erfolgte durch *in vivo* Luciferasemessungen (Maier et al. 2009). Um die Luciferaseaktivität in den lebenden Reporterzellen und gegebenenfalls zu unterschiedlichen Zeitpunkten messen zu können, durften diese nicht lysiert werden. Deswegen kam ein duales Luciferase System für diese Versuche grundsätzlich nicht in Betracht. Infolgedessen wurden die Ergebnisse der Validierungsexperimente mittels konstanter Anzahl ausgesäter Zellen pro Well normiert.

Unerwartet zeigten sich nach Puromycinselektion in den durchgeführten Screeningversuchen puromycin-insensitive Populationen (Klone) ohne messbare Reportergenaktivität der Luciferase und des EGFP (Abb. 20 [C] und Abb. 21).

Diese Beobachtungen sind besonders in Hinblick auf die Entwicklung von Medikamenten- und Antibiotikaresistenzen überaus interessant. Die Ursachen für die Entstehung der Resistenzen sind vielschichtig. Die Untersuchung der molekularen Mechanismen stellt ein wichtiges Themengebiet in der modernen Medizin dar (Rice 2009, Tenover 2006). Die Gründe für das Auftreten von promotorunabhängigen peptid-vermittelten Antibiotika-Resistenzen in den Versuchen können zum Beispiel in einer Aktivierung von zellulären Transportern oder einer Antibiotikainaktivierung liegen. Darüber hinaus sind weitere auch peptidunabhängige Mechanismen der Resistenzentwicklung denkbar. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um die Selektion von resistenten Zellklonen durch eine gerichtete Evolution (Hida et al. 2007, Alekshun und Levy 2007, Baquero und Blazquez 1997, Higgins 2007, Lima et al. 2013). Diese Erkenntnisse implizieren ein weiteres interessantes Anwendungsfeld für das etablierte Screeningverfahren und die Peptidaptamere. So bieten sie einen neuen Forschungsansatz zur Untersuchung von Medikamentenresistenzen.

6.6 Peptidaptamere

Die Stoffklasse der Peptidaptamere bietet ebenso wie die *small molecules* einen interessanten Ansatz bei der Untersuchung von Signalwegen und der Identifizierung neuer therapeutisch wirksamer Substanzen. So konnten biologisch aktive Polypeptide identifiziert werden, die beispielsweise für die Krebstherapie von Bedeutung sind (Buerger et al. 2003, Nagel-Wolfrum et al. 2004).

Bei den als Peptid-Display bezeichneten Screeningverfahren werden die Polypeptide aus kombinatorischen biologischen Peptidbibliotheken identifiziert (Borghouts et al. 2005, Kunz et al. 2006, Watt 2009, Seigneuric et al. 2011, Li et al. 2012). Zellbasierte Peptid-Displays eignen sich vor allem für Säugetierzellen. Dabei erfolgt die Suche nach biologisch aktiven Peptidaptameren anhand einer polypeptid-vermittelten Veränderung eines definierten zellulären Phänotyps. Von Vorteil ist, dass die Versuche z.B. ohne Vorkenntnisse über beteiligte Signalwege durchführbar sind (Xu et al. 2001, Peelle et al. 2001).

Wie beschrieben können die Polypeptide entweder in linearer Form oder in einem Gerüstprotein integriert vorliegen (Abschnitt 2.6.2). Die Verwendung von Gerüstproteinen ermöglicht die Präsentation der Peptidaptamere in einer bestimmten

und relativ starren Konformation an der Außenseite des Proteins. Die Konstrukte sind relativ groß. Ihre geringe Flexibilität sowie sterische Effekte können die biologische Aktivität der Polypeptide negativ beeinflussen (Borghouts et al. 2005, Peelle et al. 2001, Davis et al. 2007, Buerger et al. 2003, Mersich und Jungbauer 2008, Reverdatto et al. 2013).
Die freien Polypeptide besitzen dagegen eine größere Flexibilität und können somit in unterschiedlichen Konformationen vorliegen. Zusätzlich ist durch ihr geringes Molekulargewicht ein vom Kernlokalisationssignal (NLS) unabhängiger Transport in den Zellkern möglich. Besonders diese Eigenschaft macht sie für eine Verwendung in den Screeningversuchen interessant. Jedoch sind freie Polypeptide im Gegensatz zur Verwendung von Gerüstproteinen um ein Vielfaches proteolyse-anfälliger, was ihre biologische Funktion beeinträchtigt (Borghouts et al. 2005, Hoppe-Seyler und Butz 2000, Peelle et al. 2001).

Die Kombination aus zellbasierten, promotorabhängigen Screeningverfahren und randomisierten Peptidbibliotheken zur Identifizierung biologisch aktiver Polypeptide wurde bislang wenig untersucht. Dabei handelt es sich um einen vielversprechenden experimentellen Ansatz zur Expressionsmodulation von Zielgenen. Die entscheidenden Voraussetzungen für den Erfolg der Versuche bildeten das Design und die Generierung einer möglichst komplexen Peptidbibliothek sowie der effiziente Transfer in die Reporterzellen (Borghouts et al. 2005, Hoppe-Seyler und Butz 2000).

6.7 Retroviraler Transfer der Peptidbibliothek

Der Gentransfer der PB erfolgte durch retrovirale Transduktion. Die Transduktionseffizienz wurde mit Hilfe von FACS-Analysen bestimmt und lag bei ca. 5 %. Im Verlauf der Screeningversuche konnten Zellpopulationen und -klone bestimmt werden, die eine Induktion des Reporters (EGFP), aber keine DsRed Expression zeigten (Abb.20 [D]). Die Ursache dafür kann in einer Verschiebung des Leserahmens bei der Bibliothekssynthese begründet sein. In diesen Fällen wird in den Zellen kein funktionelles DsRed exprimiert.
Ferner liegt der Grund für die geringe Transduktionseffizienz in den Versuchen entweder bei der Synthese der Viruspartikel oder bei der Transduktion der

Reporterzellen. Im Zuge der Etablierung wurde die Transfektionseffizienz der Verpackungszellen für die Virussynthese experimentell optimiert und lag bei über 90 % (Daten nicht gezeigt). Damit war die Effizienz der Transfektion ausreichend für die Virussynthese. Die Versuche der Virussynthese unterliegen der Sicherheitsstufe 2. Aus diesem Grund wurden die initialen Optimierungsversuche der Transfektion ohne den für die Virussynthese notwendige Sicherheitsvektor (pVSV-G) durchgeführt. Das optimierte Transfektionsprotokoll scheint jedoch nicht auf die realen Versuchsbedingungen übertragbar zu sein. Daher ist für zukünftige Screeningversuche eine Optimierung der Virussynthese und der Transduktion der Reporterzellen unter den realen S2-Bedingungen unabdingbar.

6.8 Wirkmechnismen der Peptidaptamere

In den Screeningversuchen konnte eine peptid-vermittelte Reportergeninduktion in den Zellen gezeigt werden (Abschnitt 5.7). Die Ursachen für diese Induktion können überaus vielfältig sein. Dass sie jedoch durch direkte Interaktion der Polypeptide mit den Promotorsequenzen hervorgerufen wurde, ist relativ unwahrscheinlich. Vielmehr sind indirekte Wirkmechanismen der Polypeptide in den Reporterzellen zu erwarten. So wären unterschiedlichste Protein-Polypeptid- und Nukleinsäure-Polypeptid-Interaktionen vorstellbar (Abb. 31). Diese können z.B. zelluläre Prozesse wie den Zellzyklus und den DNA-Methylierungsstatus beeinflussen und somit eine Aktivierung des Reporters induzieren (Broske et al. 2009, Colas et al. 1996, Hanna et al. 2009, Lister et al. 2009, Meissner et al. 2008, Humpherys et al. 2001, Doi et al. 2009, Hoppe-Seyler et al. 2001, Molofsky et al. 2004, Cohen et al. 1998, Buerger et al. 2003, Gibert et al. 2013, Hoppe-Seyler et al. 2004, Davis et al. 2009, Gibert et al. 2011, Colas 2000, Buerger und Groner 2003).

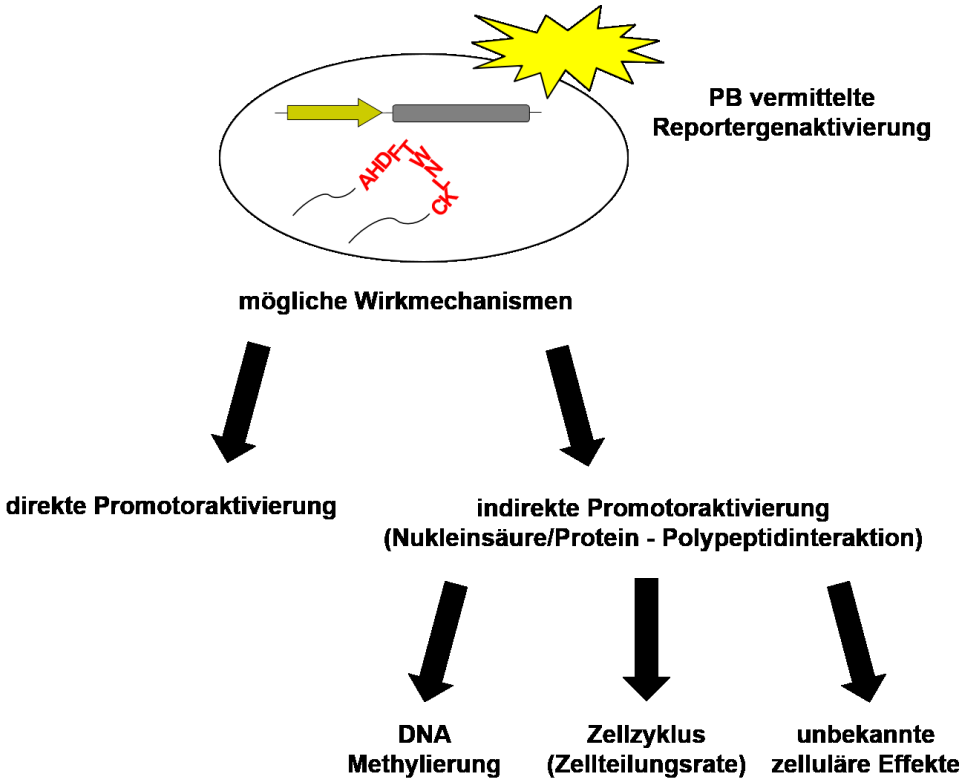

Abbildung 31: Mögliche Wirkmechanismen der aktivierenden Polypeptide

Gezeigt werden direkte Promotoraktivierung und indirekte Wirkmechanismen der Polypeptide. Bei den indirekten Einflüssen handelt es sich um zelluläre Prozesse wie DNA-Polypeptid- und Protein-Polypeptid-Interaktionen. Diese Prozesse können die Regulation des Zellzyklus und die DNA Methylierung der Zellen beeinflussen.

In weiterführenden Screeningversuchen könnten die identifizierten Polypeptide mittels gerichteter Evolution (durch gezielte oder zufällige Mutationen) modifiziert und ihre biologische Aktivität optimiert werden (Hida et al. 2007). Durch chemische Modifikationen der Polypeptide kann die biologische Funktion ebenfalls verbessert werden. Die Suche nach strukturell-verwandten organischen Verbindungen (*small molecules)* als chemische Mimetika kann ebenfalls ein äußerst vielversprechender Ansatz sein (Xu et al. 2001, Mersich und Jungbauer 2008).

6.9 Vergleich der verwendeten Selektionsstrategien

Die Verwendung eines tri-funktionellen Reporterkonstrukts ermöglichte unterschiedliche Selektions- und Screeningstrategien. Bei der Durchführung des primären PB-Screenings kamen zwei Strategien zum Einsatz. Die Induktion des

Reportergens konnte zum einen durch die Verwendung eines Selektionsantibiotikums und zum anderen mittels FACS und Zellsortierung gezeigt werden. Mit Hilfe beider Selektionsstrategien wurden aktivierende Polypeptide identifiziert (Abschnitt 5.9).

Tabelle 11: Vergleich der verwendeten Selektionsstrategien

	Puromycinselektion	**FACS-Selektion**
Zeitaufwand	2-3 Monate	1 Monat
Kostenaufwand	gering	sehr hoch
experimenteller Aufwand	hoch	gering
Selektionszeit	2-4 Wochen	keine
monoklonale Zellklone	nein	ja (Einzelzellsortierung)
Anzahl identifizierter Targets	5	10
Anzahl verifizierter Targets (20 / 42 hnT)	3 / 2	10 / 7
Anteil falsch-positiver Signale (20 hnT)	40 %	0 %
maximale Reporteraktivierung (Induktions-faktor im Vergleich zum Basiskonstrukt)	2,3	2,7

In den Validierungsexperimenten lieferte die Puromycinselektion fünf putative Targets (Einzelvarianten der PB). Von diesen fünf Varianten war bei drei Klonen eine signifikante Luciferaseaktivierung bei 20 hnT zu beobachten (2 Klone bei 42 hnT). Darüber hinaus zeigten einzelne Zellpopulationen nach Puromycinselektion keine messbare Luciferase- und EGFP-Aktivität (falsch-positive Signale). Von den insgesamt 10 getesteten Einzelklonen (nach FACS und Zellsortierung) zeigten in sekundären Experimenten alle 10 Klone bei 20 hnT und 7 Klone bei 42 hnT eine signifikante Erhöhung der Luciferaseaktivität. Ein großer Vorteil der FACS-Selektion besteht also darin, dass es möglich ist, in wesentlich kürzerer Zeit deutlich mehr putative Targets zu identifizieren und den Anteil an falsch-positiven Targets zu reduzieren. Zusätzlich wird durch die Einzelzellsortierung der experimentelle Aufwand der Versuche deutlich minimiert, da direkt monoklonale Zellklone selektiert werden (Tab. 11).

6.10 Bewertungen der Ergebnisse und weiterführende Experimente

In den durchgeführten Validierungsexperimenten lag die maximale Aktivierung des Reportergens bei Faktor 2,7. Die erhaltenen Ergebnisse der peptid-vermittelte Reporteraktivierung zeigen als *proof of principle* die Einsetzbarkeit des etablierten Systems für das PB-Screening. Aufgrund fehlender Vergleichsgrößen fällt die Bewertung der physiologischen Relevanz der Ergebnisse schwer. Dieses Problem haben allerdings viele *in vitro* Reportergenassays gemeinsam. In einem vergleichbaren Screeningsystem konnten für den *OCT4* Promotor *small molecules* identifiziert werden, die zu einer maximal vierfachen Reporteraktivierung führten. Diese Substanzen zeigten in Kombination mit einer retroviralen Expressionsinduktion der stammzell-assoziierten Transkriptionsfaktoren eine signifikante Erhöhung der Reprogrammierungseffizienz von iPS (Li et al. 2012). Obwohl die Screeningergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar sind, liefern diese Befunde jedoch einen Anhaltspunkt dafür, dass die Aktivierung in einer ähnlichen Größenordnung erfolgte. Des Weiteren zeigt sich, dass die Peptidaptamere vor allem in Kombination mit anderen Reprogrammierungsstrategien vielversprechend einsetzbar sind.

Ein weiterer wichtiger Indikator für eine physiologische Wirkung der Polypeptide wäre ein Einfluss auf die Expression des nativen Proteins. Diese Expressionsinduktion könnte mit Hilfe von Western Blot Analysen erfolgen. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bearbeitet. Der Nachweise wäre ein wichtiger Schritt für den Einsatz der Polypeptide in weiterführenden Versuchen. Dabei handelt es sich um Versuche wie Microarrays, DNA-Methylierungsasssays und Reprogrammierungsexperimente (Abb. 32). Mittels genomweiter Genexpressionsanalysen könnten polypeptid-bedingte Veränderungen in den Expressionsprofilen gezeigt und somit neue interessante Aufschlüsse bei der molekularen Regulation von Stammzellen und bei der iPS Generierung gewonnen werden. Außerdem könnten mit Hilfe der HisTag-markierten Polypeptide Proteininteraktionsstudien durchgeführt werden (Abb. 17 [A]), deren Ergebnisse wiederum als Ausgangspunkt für zukünftige Versuche dienen (Abb. 32).

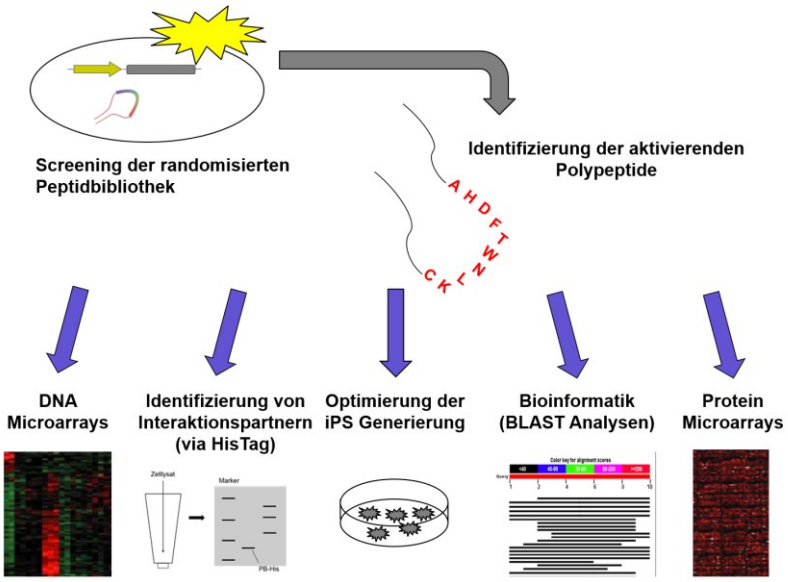

Abbildung 32: Weiterführende Versuche (Ausblick I)

Die Übersicht gibt einen Ausblick für die Weiterverwendung der im Screening identifizierten expressions-aktivierenden Polypeptide.

6.11 Sequenzhomologieanalysen

Kurze Polypeptide besitzen die Eigenschaft, Bindungsstellen von Proteinen oder Nukleinsäuren zu erkennen und zu binden. Sie wirken entweder antagonistisch oder agonistisch. Diese Effekte sind auch durch die Primär- und Sekundärstruktur der Polypeptide bedingt. Daher ist die Identifizierung von möglichen Targetproteinen mittels Sequenzhomologieanalysen ein interessanter Ansatz. Sie kann neue Aufschlüsse über die molekularen Ursachen der iPS Generierung liefern (Abb. 29). Die durchgeführten BLAST-Analysen ergaben eine Vielzahl putativer Proteine mit hoher Sequenzhomologie. Es ist zu bemerken, dass einige der identifizierten Proteine wie *HOXA1*, *KBRAS1*, *DCLK1* und *NSD3L* in Zusammenhang mit Zellteilungsprozessen, Stammzellen oder Tumorerkrankungen beschrieben worden sind (Lin et al. 2012, Delval et al. 2011, Tsou et al. 2012, Sureban et al. 2013, Nakanishi et al. 2013, Zhou et al. 2010).

Die Gene *DCLK1* und *NSD3L* sind besonders interessant. *DCLK1* (*doublecortin like kinase 1*) ist ein putativer intestinaler Stammzellmarker. Das Protein besitzt wesentliche Funktionen bei der Entstehung von intestinalen Tumorerkrankungen (Nakanishi et al. 2013). Darüber hinaus wurde eine direkte Expressionskorrelation

zwischen *DCLK1* und den stammzell-assoziierten Genen *OCT4*, *SOX2* und *NANOG* beschrieben. *In vitro* konnte bei einer Herunterregulation von *DCLK1* eine Expressionsinhibition der *OCT4* und *NANOG* auf mRNA-Ebene gezeigt werden (Sureban et al. 2013). Dieser Sachverhalt kann einen Hinweise die mögliche molekulare Wirkung des Polypeptides (# P5) geben.
Das Protein *NSD3L* gehört in die Klasse der NSD (*nuclear receptor SET domain-containing*) Histon Methyltransferasen. Durch die Modifikation von Histonen besitzen diese Enzyme wichtige epigenetische und regulatorische Funktionen. Sie sind von zentraler Bedeutung bei der Regulation von Zellzyklus, Apoptose und Zellwachstum (Jaenisch et al. 2004, Lister et al. 2009, Meissner et al. 2008, Hochedlinger und Plath 2009). Außerdem wurde ein molekularer Einfluss von *NSD3L* bei der Entstehung von Brustkrebserkrankungen beschrieben (Zhou et al. 2010). Da epigenetische Regulationsprozesse von entscheidender Bedeutung bei der iPS Generierung sind, kann eine polypeptid-vermittelte Interaktion mit dem *NSD3L* Protein möglicherweise die Ursache für die Aktivierung im Reporterassay (Polypeptid # P6) sein. Beide Beispiele können als Ausgangspunkt für weiterführende Experimente dienen. Sie sind ein Indiz für eine mögliche physiologische Relevanz der Ergebnisse.

6.12 Mögliche klinische Relevanz der Ergebnisse

Die Reprogrammierung von somatischen Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen stellte einen Durchbruch in der Wissenschaft dar. Im Vergleich zur Gewinnung embryonaler Stammzellen ist der Zugang zu iPS ethisch relativ unbedenklich. Die daraus resultierende gute Verfügbarkeit von pluripotenten Stammzellen macht einen Einsatz in der regenerativen Medizin überhaupt erst vorstellbar. Jedoch wurden durch die eingesetzten Arbeitstechniken (z.B. retroviraler Gentranfer) und die sehr geringe Effizienz der Reprogrammierung die klinischen Einsatzmöglichkeiten stark limitiert. Das führte im Verlauf der Zeit zur Etablierung von alternativen Strategien für die Erzeugung von iPS (Abb. 5). Aktuell ist die Effizienz der Reprogrammierung für einen verbreiteten Einsatz der iPS zu gering. Somit steht auch die Optimierung des Reprogrammierungsprozesses mit dem Ziel der Steigerung seiner Effizienz im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses (Yamanaka und Blau 2010, Dey und Evans 2011).

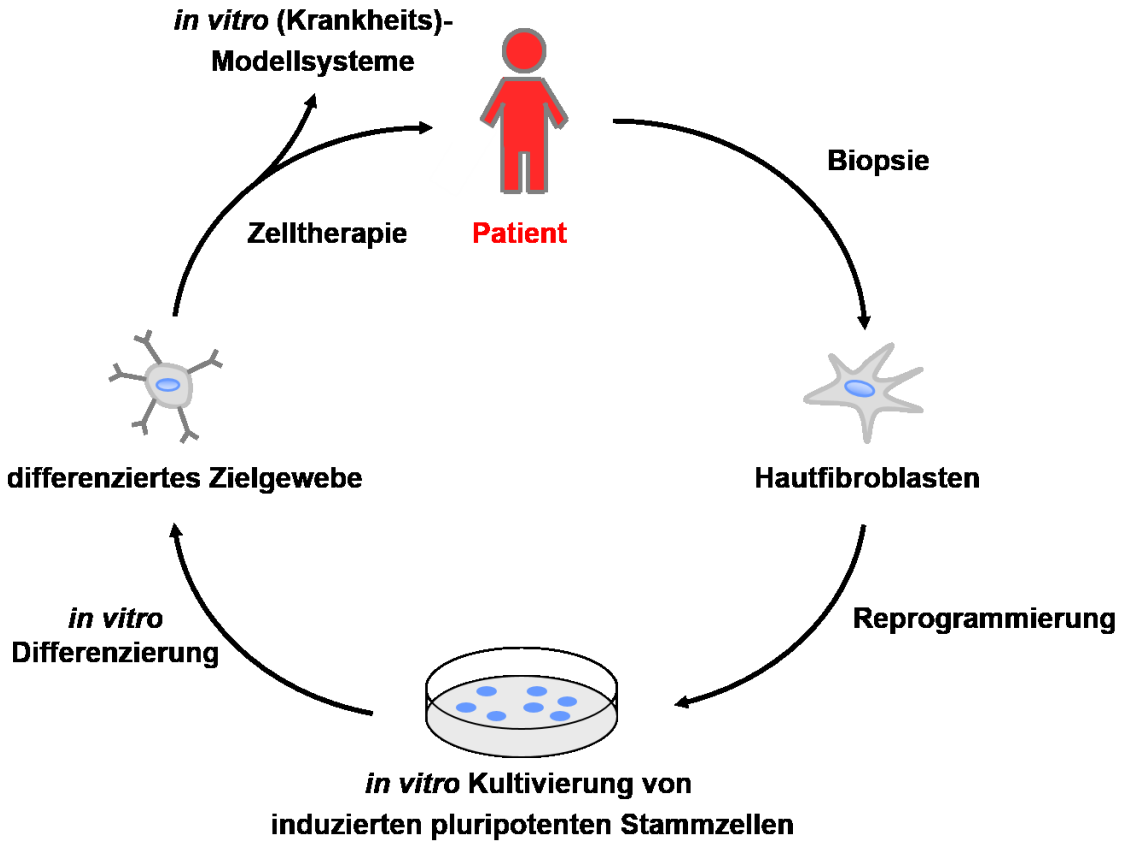

Abbildung 33: Mögliche klinische Verwendung der Ergebnisse (Ausblick II)
Die Übersicht zeigt schematisch die Generierung patienten-spezifischer iPS, die *in vitro* Kultivierung und Differenzierung in zu untersuchende Zielgewebe und ihren möglichen Einsatz in der regenerativen Medizin; modifizierte Abbildung nach (Dimos et al. 2008, Eminli 2010).

Der Einsatz von iPS-basierten Zelltherapien beim Patienten ist auf absehbare Zeit schwer vorstellbar. Denn neben unkalkulierbaren Risiken wie genomische Integrität und onkologisches Potential der Zellen weisen murine und humane iPS eine große Diversität auf (Humpherys et al. 2001, Okano et al. 2013). So wurde z.B. für miPS ein ausgangszell-abhängiges, epigenetisches Gedächtnis beschrieben (Polo et al. 2010). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Entwicklungsphasen der Ausgangszellen ebenfalls einen großen Einfluss bei der Reprogrammierung der Zellen besitzen (Eminli et al. 2009).

Im Gegensatz zur therapeutischen Verwendung von iPS werden sie bereits bei der Generierung von patienten- und zellspezifischen Modellsystemen (Medikamentenentwicklung) und für die Etablierung von *in vitro* Krankheitsmodellen eingesetzt. Diese Testsysteme werden in der Zukunft für die medizinische Forschung

fortwährend an Bedeutung gewinnen (Abb. 33). Die Etablierung solcher Verfahren erfordert eine effiziente und schnelle Herstellung der iPS (Saha und Jaenisch 2009, Lee et al. 2009, Ng und Tse 2012, Jang et al. 2012, Park et al. 2008, Soldner und Jaenisch 2012).

Mi Hilfe eines promotorbasierten Screeningsystems konnten im Verlauf der Arbeit Polypeptide identifiziert werden, die eine aktivierende Wirkung auf den humanen *OCT4* Promotor besitzen. Sollten Peptide entweder allein oder in Kombination mit klassischen Reprogrammierungsstrategien zur Erhöhung der Effizienz und zur Verkürzung des zeitlichen Aufwandes der Reprogrammierung führen, kann das hier entwickelte Screeningsystem einen wichtigen Beitrag für die Forschung leisten.

Literaturverzeichnis

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat Biotechnol, 26 (11):1276-1284.

Ahfeldt T. 2012. Switching Human Cell Fate: Reprogramming via pluripotency to adipogenesis Hamburg: Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg.

Alekshun MN, Levy SB. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell, 128 (6):1037-1050.

Alonso L, Fuchs E. 2003. Stem cells of the skin epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A, 100 Suppl 1:11830-11835.

Auld DS, Thorne N, Nguyen DT, Inglese J. 2008a. A specific mechanism for nonspecific activation in reporter-gene assays. ACS Chem Biol, 3 (8):463-470.

Auld DS, Thorne N, Maguire WF, Inglese J. 2009. Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression. Proc Natl Acad Sci U S A, 106 (9):3585-3590.

Auld DS, Southall NT, Jadhav A, Johnson RL, Diller DJ, Simeonov A, Austin CP, Inglese J. 2008b. Characterization of chemical libraries for luciferase inhibitory activity. J Med Chem, 51 (8):2372-2386.

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev, 17 (1):126-140.

Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J. 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. Stem Cells, 25 (2):500-510.

Baines IC, Colas P. 2006. Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. Drug Discov Today, 11 (7-8):334-341.

Baquero F, Blazquez J. 1997. Evolution of antibiotic resistance. Trends Ecol Evol, 12 (12):482-487.

Beyleveld G, White KM, Ayllon J, Shaw ML. 2013. New-generation screening assays for the detection of anti-influenza compounds targeting viral and host functions. Antiviral Res, 100 (1):120-132.

Blau HM, Chiu CP, Webster C. 1983. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. Cell, 32 (4):1171-1180.

Borghouts C, Kunz C, Groner B. 2005. Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther, 5 (6):783-797.

Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell, 122 (6):947-956.

Broske AM, Vockentanz L, Kharazi S, Huska MR, Mancini E, Scheller M, Kuhl C, Enns A, Prinz M, Jaenisch R, Nerlov C, Leutz A, Andrade-Navarro MA, Jacobsen SE, Rosenbauer F. 2009. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. Nat Genet, 41 (11):1207-1215.

Buerger C, Groner B. 2003. Bifunctional recombinant proteins in cancer therapy: cell penetrating peptide aptamers as inhibitors of growth factor signaling. J Cancer Res Clin Oncol, 129 (12):669-675.

Buerger C, Nagel-Wolfrum K, Kunz C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, Groner B. 2003. Sequence-specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells. J Biol Chem, 278 (39):37610-37621.

Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. 2009. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. Proc Natl Acad Sci U S A, 106 (1):157-162.

Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. 2005. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. Development, 132 (5):885-896.

Cash JN, Angerman EB, Kirby RJ, Merck L, Seibel WL, Wortman MD, Papoian R, Nelson S, Thompson TB. 2013. Development of a small-molecule screening method for inhibitors of cellular response to myostatin and activin A. J Biomol Screen, 18 (7):837-844.

Chen J, Bai G, Yang Y, Geng P, Cao Y, Zhu Y. 2007. Identifying glucagon-like peptide-1 mimetics using a novel functional reporter gene high-throughput screening assay. Peptides, 28 (4):928-934.

Chen XS, Brash AR, Funk CD. 1993. Purification and characterization of recombinant histidine-tagged human platelet 12-lipoxygenase expressed in a baculovirus/insect cell system. Eur J Biochem, 214 (3):845-852.

Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiuwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA, Pelegrini M, Plath K, Lowry WE. 2009. Induced pluripotent stem

cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. Cell Stem Cell, 5 (1):111-123.

Cohen BA, Colas P, Brent R. 1998. An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library. Proc Natl Acad Sci U S A, 95 (24):14272-14277.

Colas P. 2000. Combinatorial protein reagents to manipulate protein function. Curr Opin Chem Biol, 4 (1):54-59.

Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. 1996. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. Nature, 380 (6574):548-550.

Craig NL. 1988. The mechanism of conservative site-specific recombination. Annu Rev Genet, 22:77-105.

Crisman TJ, Parker CN, Jenkins JL, Scheiber J, Thoma M, Kang ZB, Kim R, Bender A, Nettles JH, Davies JW, Glick M. 2007. Understanding false positives in reporter gene assays: in silico chemogenomics approaches to prioritize cell-based HTS data. J Chem Inf Model, 47 (4):1319-1327.

Daley GQ, Scadden DT. 2008. Prospects for stem cell-based therapy. Cell, 132 (4):544-548.

Dar AA. 2005. Expression of short peptides in vivo to modulate protein interactions.

Davis GF, Downs TR, Farmer JA, Pierson CR, Roesgen JT, Cabrera EJ, Nelson SL. 2002. Comparison of high throughput screening technologies for luminescence cell-based reporter screens. J Biomol Screen, 7 (1):67-77.

Davis JJ, Tkac J, Laurenson S, Ko Ferrigno P. 2007. Peptide aptamers in label-free protein detection: 1. Characterization of the immobilized scaffold. Anal Chem, 79 (3):1089-1096.

Davis JJ, Tkac J, Humphreys R, Buxton AT, Lee TA, Ko Ferrigno P. 2009. Peptide aptamers in label-free protein detection: 2. Chemical optimization and detection of distinct protein isoforms. Anal Chem, 81 (9):3314-3320.

De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Alcaina Y. 2010. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. Stem Cell Rev, 6 (4):633-649.

de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. Mol Cell Biol, 7 (2):725-737.

Delval S, Taminiau A, Lamy J, Lallemand C, Gilles C, Noel A, Rezsohazy R. 2011. The Pbx interaction motif of Hoxa1 is essential for its oncogenic activity. PLoS One, 6 (9):e25247.

Dey D, Evans GR. 2011. Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells by Nuclear Reprogramming. Stem Cells Int, 2011:619583.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science, 321 (5893):1218-1221.

Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP. 2009. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. Nat Genet, 41 (12):1350-1353.

Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes LE, Gani D, Ryan MD. 2001a. Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. J Gen Virol, 82 (Pt 5):1013-1025.

Donnelly ML, Hughes LE, Luke G, Mendoza H, ten Dam E, Gani D, Ryan MD. 2001b. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. J Gen Virol, 82 (Pt 5):1027-1041.

Drews K, Jozefczuk J, Prigione A, Adjaye J. 2012. Human induced pluripotent stem cells--from mechanisms to clinical applications. J Mol Med (Berl), 90 (7):735-745.

Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, Chen J, Ding S. 2011. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. Nat Cell Biol, 13 (3):215-222.

Eminli S. 2010. <<The>> role of differentiation state in reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells.

Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, Hochedlinger K. 2009. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. Nat Genet, 41 (9):968-976.

Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, 292 (5819):154-156.

Fan F, Wood KV. 2007. Bioluminescent assays for high-throughput screening. Assay Drug Dev Technol, 5 (1):127-136.

Fribley AM, Cruz PG, Miller JR, Callaghan MU, Cai P, Narula N, Neubig RR, Showalter HD, Larsen SD, Kirchhoff PD, Larsen MJ, Burr DA, Schultz PJ, Jacobs RR, Tamayo-Castillo G, Ron D, Sherman DH, Kaufman RJ. 2011. Complementary cell-based high-throughput screens identify novel modulators of the unfolded protein response. J Biomol Screen, 16 (8):825-835.

Gibert B, Simon S, Dimitrova V, Diaz-Latoud C, Arrigo AP. 2013. Peptide aptamers: tools to negatively or positively modulate HSPB1(27) function. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 368 (1617):20120075.

Gibert B, Hadchity E, Czekalla A, Aloy MT, Colas P, Rodriguez-Lafrasse C, Arrigo AP, Diaz-Latoud C. 2011. Inhibition of heat shock protein 27 (HspB1) tumorigenic functions by peptide aptamers. Oncogene, 30 (34):3672-3681.

Gomez Lahoz E, Lopez de Haro MS, Nieto A, Esponda P. 1991. Use of puromycin N-acetyltransferase (PAC) as a new reporter gene in transgenic animals. Nucleic Acids Res, 19 (12):3465.

Gomez Lahoz E, Lopez de Haro MS, Esponda P, Nieto A. 1992. Tissue-specific and hormonally regulated expression of the puromycin N-acetyltransferase-encoding gene under control of the rabbit uteroglobin promoter in transgenic mice. Gene, 117 (2):255-258.

González Carvajal B. 2010. Charakterisierung und Bedeutung des Tumor-assoziierten Antigens EpCAM in murinen embryonalen Stammzellen und Etablierung eines transgenen Mausmodells zur in vivo Studie [Dissertation, LMU München].

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol, 36 (1):59-74.

Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. 2011. Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. Nat Rev Drug Discov, 10 (12):915-929.

Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES. 2009. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. Nature, 458 (7235):223-227.

Hamdi A, Colas P. 2012. Yeast two-hybrid methods and their applications in drug discovery. Trends Pharmacol Sci, 33 (2):109-118.

Hancock MK, Xia M, Frey ES, Sakamuru S, Bi K. 2009. HTS-compatible beta-lactamase transcriptional reporter gene assay for interrogating the heat shock response pathway. Curr Chem Genomics, 3:1-6.

Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creyghton MP, van Oudenaarden A, Jaenisch R. 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. Nature, 462 (7273):595-601.

Hargrove JL, Schmidt FH. 1989. The role of mRNA and protein stability in gene expression. FASEB J, 3 (12):2360-2370.

Hellwig I. 2011. Differentielle DNA Methylierung und Analysen zum Transkriptionsfaktor hoxA9 in CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen

Hida K, Hanes J, Ostermeier M. 2007. Directed evolution for drug and nucleic acid delivery. Adv Drug Deliv Rev, 59 (15):1562-1578.

Higgins CF. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature, 446 (7137):749-757.

Hitoshi Y, Gururaja T, Pearsall DM, Lang W, Sharma P, Huang B, Catalano SM, McLaughlin J, Pali E, Peelle B, Vialard J, Janicot M, Wouters W, Luyten W, Bennett MK, Anderson DC, Payan DG, Lorens JB, Bogenberger J, Demo S. 2003. Cellular Localization and Antiproliferative Effect of Peptides Discovered from a Functional Screen of a Retrovirally Delivered Random Peptide Library. Chemistry & Biology, 10 (10):975-987.

Hochedlinger K, Jaenisch R. 2003. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. N Engl J Med, 349 (3):275-286.

Hochedlinger K, Jaenisch R. 2006. Nuclear reprogramming and pluripotency. Nature, 441 (7097):1061-1067.

Hochedlinger K, Plath K. 2009. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. Development, 136 (4):509-523.

Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S. 2009. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. Nature, 460 (7259):1132-1135.

Hoppe-Seyler F, Butz K. 2000. Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine. J Mol Med (Berl), 78 (8):426-430.

Hoppe-Seyler F, Crnkovic-Mertens I, Tomai E, Butz K. 2004. Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function. Curr Mol Med, 4 (5):529-538.

Hoppe-Seyler F, Crnkovic-Mertens I, Denk C, Fitscher BA, Klevenz B, Tomai E, Butz K. 2001. Peptide aptamers: new tools to study protein interactions. J Steroid Biochem Mol Biol, 78 (2):105-111.

Hotta A, Cheung AY, Farra N, Vijayaragavan K, Seguin CA, Draper JS, Pasceri P, Maksakova IA, Mager DL, Rossant J, Bhatia M, Ellis J. 2009. Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. Nat Methods, 6 (5):370-376.

Hu T, Fu Q, Chen P, Zhang K, Guo D. 2009. Generation of a stable mammalian cell line for simultaneous expression of multiple genes by using 2A peptide-based lentiviral vector. Biotechnol Lett, 31 (3):353-359.

Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA. 2008. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. Nat Biotechnol, 26 (7):795-797.

Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM, 3rd, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R. 2001. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. Science, 293 (5527):95-97.

Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. 2009. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. Cell Stem Cell, 5 (5):491-503.

Inglese J, Auld DS, Jadhav A, Johnson RL, Simeonov A, Yasgar A, Zheng W, Austin CP. 2006. Quantitative high-throughput screening: a titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries. Proc Natl Acad Sci U S A, 103 (31):11473-11478.

Inouye S, Tsuji FI. 1994. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. FEBS Lett, 341 (2-3):277-280.

Izpisua Belmonte JC, Ellis J, Hochedlinger K, Yamanaka S. 2009. Induced pluripotent stem cells and reprogramming: seeing the science through the hype. Nat Rev Genet, 10 (12):878-883.

Jackson P, Harrington J. 2005. High-throughput target discovery using cell-based genetics. Drug Discovery Today, 10 (1):53-60.

Jaenisch R, Young R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell, 132 (4):567-582.

Jaenisch R, Hochedlinger K, Blelloch R, Yamada Y, Baldwin K, Eggan K. 2004. Nuclear cloning, epigenetic reprogramming, and cellular differentiation. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 69:19-27.

Jang J, Yoo JE, Lee JA, Lee DR, Kim JY, Huh YJ, Kim DS, Park CY, Hwang DY, Kim HS, Kang HC, Kim DW. 2012. Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. Exp Mol Med, 44 (3):202-213.

Kain SR, Ganguly S. 2001. Overview of Genetic Reporter Systems. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. Nature, 458 (7239):771-775.

Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell, 4 (6):472-476.

Kitamura T, Onishi M, Kinoshita S, Shibuya A, Miyajima A, Nolan GP. 1995. Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. Proc Natl Acad Sci U S A, 92 (20):9146-9150.

Koressaar T, Remm M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics, 23 (10):1289-1291.

Krueger J, Liu D, Scholz K, Zimmer A, Shi Y, Klein C, Siekmann A, Schulte-Merker S, Cudmore M, Ahmed A, le Noble F. 2011. Flt1 acts as a negative regulator of tip cell formation and branching morphogenesis in the zebrafish embryo. Development, 138 (10):2111-2120.

Kuhl SJ, Kuhl M. 2013. On the role of Wnt/beta-catenin signaling in stem cells. Biochim Biophys Acta, 1830 (2):2297-2306.

Kunz C, Borghouts C, Buerger C, Groner B. 2006. Peptide aptamers with binding specificity for the intracellular domain of the ErbB2 receptor interfere with AKT signaling and sensitize breast cancer cells to Taxol. Mol Cancer Res, 4 (12):983-998.

Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, Studer L. 2009. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. Nature, 461 (7262):402-406.

Li W, Tian E, Chen ZX, Sun G, Ye P, Yang S, Lu D, Xie J, Ho TV, Tsark WM, Wang C, Horne DA, Riggs AD, Yip ML, Shi Y. 2012. Identification of Oct4-activating compounds that enhance reprogramming efficiency. Proc Natl Acad Sci U S A, 109 (51):20853-20858.

Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. 2005. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. Blood, 105 (2):635-637.

Lima TB, Pinto MF, Ribeiro SM, de Lima LA, Viana JC, Gomes Junior N, Candido Ede S, Dias SC, Franco OL. 2013. Bacterial resistance mechanism: what proteomics can elucidate. FASEB J, 27 (4):1291-1303.

Lin H, Wang Y, Zhang X, Liu B, Zhang W, Cheng J. 2012. Prognostic significance of kappaB-Ras1 expression in gliomas. Med Oncol, 29 (2):1272-1279.

Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature, 462 (7271):315-322.

Lo B, Parham L. 2009. Ethical issues in stem cell research. Endocr Rev, 30 (3):204-213.

Lorens JB, Sousa C, Bennett MK, Molineaux SM, Payan DG. 2001. The use of retroviruses as pharmaceutical tools for target discovery and validation in the field of functional genomics. Curr Opin Biotechnol, 12 (6):613-621.

Lu JX, Peng Y, Meng ZF, Jin LQ, Lu YS, Guan MX. 2005. Rational design of an EGF-IL18 fusion protein: implication for developing tumor therapeutics. Biochem Biophys Res Commun, 334 (1):157-161.

Maier B, Wendt S, Vanselow JT, Wallach T, Reischl S, Oehmke S, Schlosser A, Kramer A. 2009. A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. Genes Dev, 23 (6):708-718.

Majeti R, Park CY, Weissman IL. 2007. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. Cell Stem Cell, 1 (6):635-645.

Mao R, Xiao W, Liu H, Chen B, Yi B, Kraj P, She JX. 2013. Systematic evaluation of 640 FDA drugs for their effect on CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells using a novel cell-based high throughput screening assay. Biochem Pharmacol, 85 (10):1513-1524.

Martel V, Filhol O, Colas P, Cochet C. 2006. p53-dependent inhibition of mammalian cell survival by a genetically selected peptide aptamer that targets the regulatory subunit of protein kinase CK2. Oncogene, 25 (56):7343-7353.

Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 78 (12):7634-7638.

Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. Nature, 454 (7205):766-770.

Mersich C, Jungbauer A. 2008. Generation of bioactive peptides by biological libraries. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 861 (2):160-170.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell, 113 (5):631-642.

Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. 2004. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. Curr Opin Cell Biol, 16 (6):700-707.

Mrowka R, Steege A, Kaps C, Herzel H, Thiele BJ, Persson PB, Bluthgen N. 2007. Dissecting the action of an evolutionary conserved non-coding region on renin promoter activity. Nucleic Acids Res, 35 (15):5120-5129.

Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, Groner B. 2004. The interaction of specific peptide aptamers with the DNA binding domain and the dimerization domain of the transcription factor Stat3 inhibits transactivation and induces apoptosis in tumor cells. Mol Cancer Res, 2 (3):170-182.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat Biotechnol, 26 (1):101-106.

Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T. 2013. Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. Nat Genet, 45 (1):98-103.

Nandi AK, Roginski RS, Gregg RG, Smithies O, Skoultchi AI. 1988. Regulated expression of genes inserted at the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. Proc Natl Acad Sci U S A, 85 (11):3845-3849.

Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. 2009. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. Circulation, 120 (5):408-416.

Neuringer IP, Randell SH. 2004. Stem cells and repair of lung injuries. Respir Res, 5:6.

Ng HH, Surani MA. 2011. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. Nat Cell Biol, 13 (5):490-496.

Ng KM, Tse HF. 2012. Modeling hereditary cardiac disease with patient-specific-induced pluripotent stem cells: opportunities and concerns. J Cardiovasc Pharmacol, 60 (4):406-407.

Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M. 2011. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. J Biol Chem, 286 (6):4760-4771.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat Genet, 24 (4):372-376.

Nouvion AL, Thibaut J, Lohez OD, Venet S, Colas P, Gillet G, Lalle P. 2007. Modulation of Nr-13 antideath activity by peptide aptamers. Oncogene, 26 (5):701-710.

Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, Ikeda E, Yamanaka S, Miura K. 2013. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. Circ Res, 112 (3):523-533.

Okita K, Yamanaka S. 2011. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 366 (1575):2198-2207.

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature, 448 (7151):313-317.

Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. 2010. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. Nat Protoc, 5 (3):418-428.

Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science, 322 (5903):949-953.

Paguio A, Stecha P, Wood KV, Fan F. 2010. Improved dual-luciferase reporter assays for nuclear receptors. Curr Chem Genomics, 4:43-49.

Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell, 134 (5):877-886.

Patel DA, Patel AC, Nolan WC, Zhang Y, Holtzman MJ. 2012. High throughput screening for small molecule enhancers of the interferon signaling pathway to drive next-generation antiviral drug discovery. PLoS One, 7 (5):e36594.

Paulmurugan R, Gambhir SS. 2005. Novel fusion protein approach for efficient high-throughput screening of small molecule-mediating protein-protein interactions in cells and living animals. Cancer Res, 65 (16):7413-7420.

Peelle B, Lorens J, Li W, Bogenberger J, Payan DG, Anderson DC. 2001. Intracellular protein scaffold-mediated display of random peptide libraries for phenotypic screens in mammalian cells. Chem Biol, 8 (5):521-534.

Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochedlinger K. 2010. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nat Biotechnol, 28 (8):848-855.

Raff M. 2003. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? Annu Rev Cell Dev Biol, 19:1-22.

Reverdatto S, Rai V, Xue J, Burz DS, Schmidt AM, Shekhtman A. 2013. Combinatorial Library of Improved Peptide Aptamers, CLIPs to Inhibit RAGE Signal Transduction in Mammalian Cells. PLoS One, 8 (6):e65180.

Rice LB. 2009. The clinical consequences of antimicrobial resistance. Curr Opin Microbiol, 12 (5):476-481.

Roepe PD. 2001. A peptide needle in a signaling haystack. Nat Genet, 27 (1):6-8.

Saha K, Jaenisch R. 2009. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. Cell Stem Cell, 5 (6):584-595.

Sambrook J. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual Cold Spring Harbor, N.Y. :: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sauer B. 1994. Site-specific recombination: developments and applications. Curr Opin Biotechnol, 5 (5):521-527.

Seigneuric R, Gobbo J, Colas P, Garrido C. 2011. Targeting cancer with peptide aptamers. Oncotarget, 2 (7):557-561.

Shao L, Wu WS. 2010. Gene-delivery systems for iPS cell generation. Expert Opin Biol Ther, 10 (2):231-242.

Shao L, Feng W, Sun Y, Bai H, Liu J, Currie C, Kim J, Gama R, Wang Z, Qian Z, Liaw L, Wu WS. 2009. Generation of iPS cells using defined factors linked via the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame. Cell Res, 19 (3):296-306.

Shi Y, Do JT, Desponts C, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. 2008a. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell, 2 (6):525-528.

Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. 2008b. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. Cell Stem Cell, 3 (5):568-574.

Siebring-van Olst E, Vermeulen C, de Menezes RX, Howell M, Smit EF, van Beusechem VW. 2013. Affordable luciferase reporter assay for cell-based high-throughput screening. J Biomol Screen, 18 (4):453-461.

Simeonov A, Jadhav A, Thomas CJ, Wang Y, Huang R, Southall NT, Shinn P, Smith J, Austin CP, Auld DS, Inglese J. 2008. Fluorescence spectroscopic profiling of compound libraries. J Med Chem, 51 (8):2363-2371.

Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. 1963. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. J Cell Physiol, 62:327-336.

Simons GF, Konings RN, Schoenmakers JG. 1981. Genes VI, VII, and IX of phage M13 code for minor capsid proteins of the virion. Proc Natl Acad Sci U S A, 78 (7):4194-4198.

Smith A. 2006. A glossary for stem-cell biology. Nature, 441 (7097):1060-1060.

Smith GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science, 228 (4705):1315-1317.

Smith GR. 1988. Homologous recombination in procaryotes. Microbiol Rev, 52 (1):1-28.

Soldner F, Jaenisch R. 2012. Medicine. iPSC disease modeling. Science, 338 (6111):1155-1156.

Song B, Niclis JC, Alikhan MA, Sakkal S, Sylvain A, Kerr PG, Laslett AL, Bernard CA, Ricardo SD. 2011. Generation of induced pluripotent stem cells from human kidney mesangial cells. J Am Soc Nephrol, 22 (7):1213-1220.

Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol, 98 (3):503-517.

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. 2001. Stem cells find their niche. Nature, 414 (6859):98-104.

Stadtfeld M, Hochedlinger K. 2010. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. Genes Dev, 24 (20):2239-2263.

Sureban SM, May R, Qu D, Weygant N, Chandrakesan P, Ali N, Lightfoot SA, Pantazis P, Rao CV, Postier RG, Houchen CW. 2013. DCLK1 Regulates Pluripotency and Angiogenic Factors via microRNA-Dependent Mechanisms in Pancreatic Cancer. PLoS One, 8 (9):e73940.

Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 126 (4):663-676.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131 (5):861-872.

Tenover FC. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med, 119 (6 Suppl 1):S3-10; discussion S62-70.

Thomas P, Smart TG. 2005. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. J Pharmacol Toxicol Methods, 51 (3):187-200.

Thompson JF, Hayes LS, Lloyd DB. 1991. Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. Gene, 103 (2):171-177.

Thompson PA, Wang S, Howett LJ, Wang MM, Patel R, Averill A, Showalter RE, Li B, Appleman JR. 2008. Identification of ligand binding by protein stabilization: comparison of ATLAS with biophysical and enzymatic methods. Assay Drug Dev Technol, 6 (1):69-81.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282 (5391):1145-1147.

Tsou WL, Sheedlo MJ, Morrow ME, Blount JR, McGregor KM, Das C, Todi SV. 2012. Systematic analysis of the physiological importance of deubiquitinating enzymes. PLoS One, 7 (8):e43112.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res, 40 (15):e115.

Uozumi K. 2010. Treatment of adult T-cell leukemia. J Clin Exp Hematop, 50 (1):9-25.

Utsunomiya A, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Hanada S, Uozumi K, Yashiki S, Tara M, Kawano F, Saburi Y, Kikuchi H, Hara M, Sao H, Morishima Y, Kodera Y, Sonoda S, Tomonaga M. 2001. Improved outcome of adult T cell leukemia/lymphoma with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant, 27 (1):15-20.

Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S. 2002. Guidelines for human gene nomenclature. Genomics, 79 (4):464-470.

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell, 7 (5):618-630.

Watt PM. 2009. Phenotypic screening of phylomer peptide libraries derived from genome fragments to identify and validate new targets and therapeutics. Future Med Chem, 1 (2):257-265.

Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. Nature, 447 (7140):87-91.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 385 (6619):810-813.

Wolkowicz R, Nolan GP, Curran MA. 2004. Lentiviral vectors for the delivery of DNA into mammalian cells. Methods Mol Biol, 246:391-411.

Wolkowicz R, Jager GC, Nolan GP. 2005. A random peptide library fused to CCR5 for selection of mimetopes expressed on the mammalian cell surface via retroviral vectors. J Biol Chem, 280 (15):15195-15201.

Xu X, Leo C, Jang Y, Chan E, Padilla D, Huang BC, Lin T, Gururaja T, Hitoshi Y, Lorens JB, Anderson DC, Sikic B, Luo Y, Payan DG, Nolan GP. 2001. Dominant effector genetics in mammalian cells. Nat Genet, 27 (1):23-29.

Yamanaka S. 2009. A fresh look at iPS cells. Cell, 137 (1):13-17.

Yamanaka S, Blau HM. 2010. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. Nature, 465 (7299):704-712.

Yang CS, Li Z, Rana TM. 2011. microRNAs modulate iPS cell generation. RNA, 17 (8):1451-1460.

Yang W, Mills JA, Sullivan S, Liu Y, French DL, Gadue P. 2008. iPSC Reprogramming from Human Peripheral Blood Using Sendai Virus Mediated Gene Transfer. StemBook. Cambridge (MA).

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 318 (5858):1917-1920.

Zhang F, Citra F, Wang DA. 2011. Prospects of induced pluripotent stem cell technology in regenerative medicine. Tissue Eng Part B Rev, 17 (2):115-124.

Zhang G, Gurtu V, Kain SR. 1996. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun, 227 (3):707-711.

Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW. 2000. The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. J Biol Chem, 275 (24):18391-18398.

Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. 2011. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. Nature, 474 (7350):212-215.

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell, 4 (5):381-384.

Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. Nature, 455 (7213):627-632.

Zhou Z, Thomsen R, Kahns S, Nielsen AL. 2010. The NSD3L histone methyltransferase regulates cell cycle and cell invasion in breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun, 398 (3):565-570.

Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Ralf Mrowka für die langjährige Betreuung. Durch seine Unterstützung bei der Auswahl des Themas und der Anfertigung der Dissertation hat er wichtige Impulse für meine wissenschaftliche Arbeit gegeben.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Otmar Huber für die Unterstützung meines Promotionsvorhabens und die Begutachtung der Arbeit bedanken.

Ein Dank geht auch an Prof. Pontus Persson und Prof. Michael Fähling von Institut für Vegetative Physiologie an der Charité in Berlin, die mir die Möglichkeit eingeräumt haben, die Experimente im institutseigenen Labor durchzuführen.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Mitarbeitern der *Flow Cytometry Core Facility* (FCCF) am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in Berlin für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der FACS-Analysen.

Ein besonderer Dank gilt Christine Reinhold für die tatkräftige Unterstützung bei der praktischen Arbeit im Labor. Weiterhin möchte ich mich bei Mitarbeitern des Instituts für Vegetative Physiologie, des *Center for Cardiovascular Research* der Charité in Berlin und der Arbeitsgruppe Experimentelle Nephrologie am Universitätsklinikum in Jena für die kollegiale und produktive Arbeitsatmosphäre bedanken.

Letztendlich bin ich meiner Frau sowie meinen Eltern für die Hilfe und Unterstützung während der Anfertigung meiner Dissertation überaus dankbar.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich keine Person bei der Auswahl und Auswertung der Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Berlin, 20.1.2014